LA BIOSYNTHÈSE DES STÉROLS DANS LES TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO*

PAR

PIERRE BENVENISTE

STRASBOURG 1967

N° d'ordre

THÈSES

PRÉSENTÉES

À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR -ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

PIERRE BENVENISTE
INGÉNIEUR E.N.S.C.S.
DOCTEUR-INGÉNIEUR
ATTACHÉ DE RECHERCHES AU C.N.R.S.

PREMIÈRE THÈSE

LA BIOSYNTHÈSE DES STÉROLS DANS LES TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO*

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 20 Décembre 1967 devant la Commission d'Examen:

M. G. OURISSON	Président
N. L. HIRTH	Membre du Jury
M. R. J. GAUTHERET (Membre de l'Institut)	Membre du Jury
N. E. LEDERER	Membre du Jury

Imprimé Berenz
Représentant: M. Kiefer — Nouvelle Cité 17 — 67 Lingolsheim

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTE DES SCIENCES

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN

Doyens Honoraires : A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, G. MILLOT.

Professeurs Honoraires : P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, Mle S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P.L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, Ch.SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de Conférences Honoraire : R. WEIL.

Professeurs :

H.J. MARESQUELLE..........	T.	Biologie végétale
A.ROUSSEL..................	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER...............	T.	Chimie générale
J. ROTHE...................	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE................	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN................	T.	Zoologie et Embryologie experimentale
A. MAILLARD................	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY..............	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN................	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE.....................	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD.................	T.	Chimie Organique
Mle M. PEREY...............	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB..............	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY....................	T.	Biologie générale
H. BENOIT..................	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER....................	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT..................	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET...............	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER.................	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER..................	T.	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU.............	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE................	T.	Physique générale
F. STUTINSKY...............	T.	Physiologie générale
B. WURTZ...................	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET..................	T.	Electrochimie
G. OURISSON................	T.T.P.	Chimie
Cl. LEVI...................	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE...................	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF....................	T.	Physique générale
J. FRENKEL.................	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG.................	T.	Physique
J.P. LONCHAMP..............	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE..............	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET................	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER..............	T.T.P.	Physique
A. ROCHE...................	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH...................	T.	Microbiologie
A. SIGOT...................	P.S.C.	Zoologie

J. COGNE..................... T.T.P. Géologie
A. FUCHS..................... T. Mécanique rationnelle
A. GALLMANN.................. T.T.P. Physique
P. MIALHE.................... T.T.P..Physiologie animale
J.F. EBEL.................... T. Chimie biologique
J. PARROD.................... T.T.P. Chimie
R. WEY....................... T.T.P. Chimie
Mme D. MAGNAC................ T.T.P. Physique
M. DAUNE..................... P.S.C. Physique
J.P. ADLOFF.................. T.T.P. Chimie nucléaire
D. BERNARD................... T.T.P. Méthodes mathématiques de la physique
M. ZISMAN.................... T.T.P. Mathématiques
E. DANIEL.................... T. Physique expérimentale
P. CHEVALLIER................ P.S.C. Physique
J. GREMILLARD................ T.T.P. Mathématiques
P. CARTIER................... T. Mathématiques M.P.C.
G. REEB...................... T. Topologie
F. NORGUET................... T. Analyse supérieure
R. CHAUVIN................... T. Psychophysiologie
J. WUCHER.................... P.S.C. Physique
Mme M. BRINI................. P.S.C. Chimie
G. PERNY..................... P.S.C. Physique
R. BARO...................... P.S.C. Physique
H. DURANTON.................. P.S.C. Botanique
R. WEISS..................... T.T.P. Chimie
P. FEDERLIN.................. T.T.P. Chimie
J. LERAY..................... P.S.C. Physique
J.P. SCHWING................. P.S.C. Chimie
M. SIESKIND.................. P.S.C. Physique
G. MONSONEGO................. P.S.C. Physique mathématique
P. GABRIEL................... T.T.P. Mathématiques
C. WIPPLER................... T. Physicochimie des Hauts Polymères Industriels
P.A. MEYER................... T.T.P. Mathématiques
G. WEILL..................... P.S.C. Physique
J.M. BLOCH................... T. Chimie
A. CLAUSS.................... P.S.C. Chimie
R. OMNES..................... P.S.C. Physique théorique
E. FOLLENIUS................. P.S.C. Zoologie
J. LUCAS..................... P.S.C. Géologie

Professeurs associés :

S.R. DE GROOT................ Physique nucléaire
K. VESELY.................... Physicochimie macromoléculaire

Maîtres de Conférences :

H. DANAN..................... Physique
Mme WINTER Chr. .... Physique
J.P. EBERHART................ Minéralogie
Mme D. CAGNIANT.............. Chimie
X. FERNIQUE.................. Mathématiques
J. STREITH................... Chimie
J. WEIL...................... Chimie biologique
F. GAUTIER................... Physique propédeutique
G. SUTTER.................... Physique électronique
D. FOATA..................... Mathématiques
J.L. VERDIER................. Mathématiques
J.M. LEHN.................... Chimie
Cl. ROBERT................... Physique

Maîtres de Conférences Associés :

V. AVANISSIAN................ Mathématiques
R.A. MASSY-WESTROPP.......... Chimie Organique

Secrétaire : G. SAINT-PE.

A mes parents

A tous les miens

A Monsieur le Professeur L. Hirth

Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans votre groupe et de m'avoir prodigué, tout au long de mon travail des conseils éclairés et des encouragements répétés.

A Monsieur le Professeur G. Ourisson

Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour la formation que vous m'avez donnée et pour l'intérêt très vif que vous avez manifesté tout au long de ce travail.

Les recherches résumées dans cette thèse ont été entreprises dans le cadre d'une action conjointe, aidée par les sections de Biologie cellulaire et de Chimie Organique du C.N.R.S., ultérieurement transformée en Recherche coopérative sur Programme n° 34 intitulée :

"L'utilisation des tissus végétaux cultivés in vitro pour l'étude des produits naturels".

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans la mise à notre disposition d'un laboratoire de recherches par Monsieur le Professeur J.H. VIVIEN, Directeur du Département des Applications Biologiques du C.R.N. de Cronenbourg.

Je remercie tous mes camarades de laboratoire qui ont collaboré à ce travail par leur aide, leurs conseils et leur précieuse amitié.

Mes remerciements vont tout particulièrement à MM. B. Fritig et J.D. Ehrhardt avec lesquels j'ai eu de fructueuses discussions.

Mes remerciements vont également à :

- à Monsieur Demarcillac pour les ultracentrifugations analytiques
- à Mesdemoiselles P. Elbling et P. Fund pour leur compétence dans la culture des tissus végétaux.

Je suis heureux de témoigner ma reconnaissance à Mademoiselle A. Durr. Sans sa compétence dans les techniques d'obtention et d'entretien des tissus de plantes cultivées <u>in vitro</u> ce travail n'aurait pas pu être effectué.

I PARTIE

LA BIOSYNTHESE DES STEROLS DANS LES TISSUS DE TABAC CULTIVES IN VITRO

INTRODUCTION

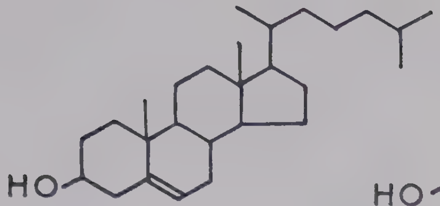
On sait que la plupart des végétaux supérieurs contiennent des stérols (1, 2) ; ceux-ci sont des constituants constants du cytoplasme et participeraient à la constitution du réseau ergastoplasmique. Cette fonction des stérols a été d'ailleurs démontrée dans la levure (3). C'est ainsi que l'observation au microscope électronique de cellules de levure cultivées en anaérobiose, c'est-à-dire dans des conditions où la synthèse de l'ergostérol est bloquée au niveau du squalène, révèle l'absence de membranes nucléaires, d'ergastoplasme et de mitochondries ; ces organelles réapparaissent si de l'ergostérol est fourni au milieu, et alors les cultures peuvent vivre indéfiniment. On sait par ailleurs que les bactéries ne contiennent pas de système ergastoplasmique et qu'elles ne synthétisent pas non plus de stérols (4).

Ainsi, la présence de stérols dans la cellule pourrait être liée à un type d'organisation subcellulaire commun aux animaux et aux végétaux.

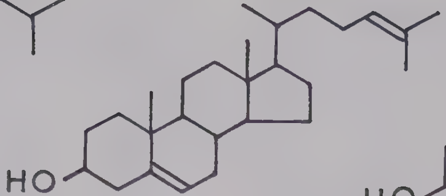
Le cholestérol (I) est le stérol dominant chez les animaux ; chez les végétaux, les stérols possèdent généralement un groupement alcoyle dans la chaîne latérale (Tableau I). Chez les végétaux unicellulaires (levure, algues, etc...), le stérol dominant est l'ergostérol (VIII) ; ce dernier possède un groupement méthyle en C-24. Chez les végétaux supérieurs, on a le plus souvent affaire à un mélange complexe de "phytostérols" comprenant des groupements méthylène, méthyle, éthylidène et éthyle en C - 24 (2). Cependant, le β - sitostérol (XII) ou éthyl - 24 R cholestérol est le stérol le plus répandu chez les plantes : la liste des espèces dans laquelle il a été signalé serait trop longue à établir ; sans beaucoup se risquer, on peut parler d'un constituant universel des végétaux.

Parmi les autres stérols les plus souvent rencontrés, citons le stigmastérol (XIV), l'α - spinastérol (XV), le campestérol ou méthyl - 24 R cholestérol (XI), le fucostérol (X), le brassicastérol

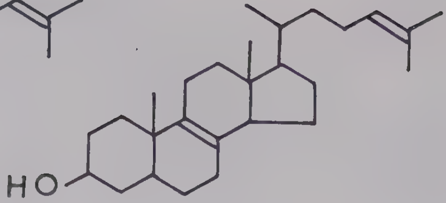
TABLEAU I Famille du cholestérol



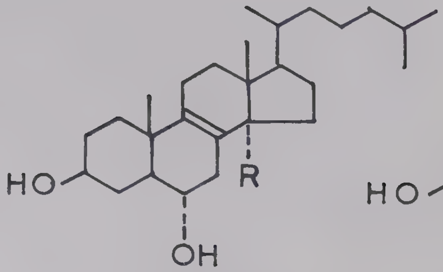
I



II

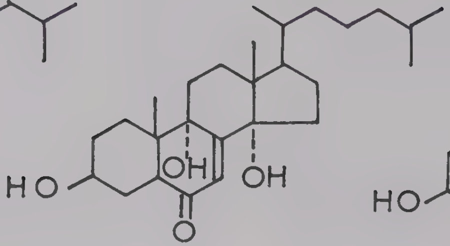


III

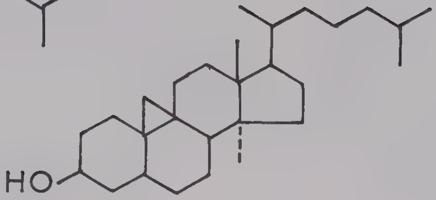


IV R=H

V R=CH_3

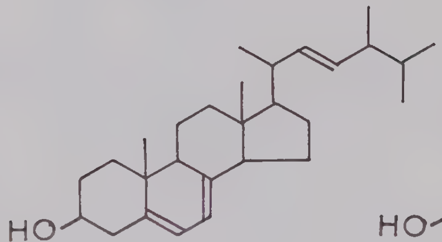


VI

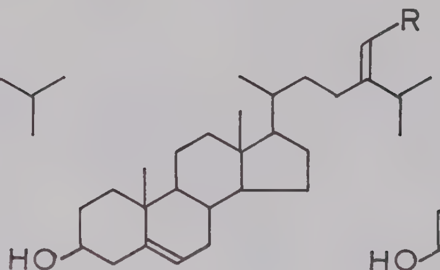


VII

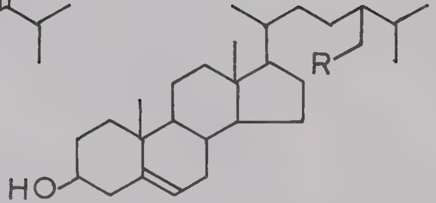
TABLEAU II Alcoyl-24 stérols



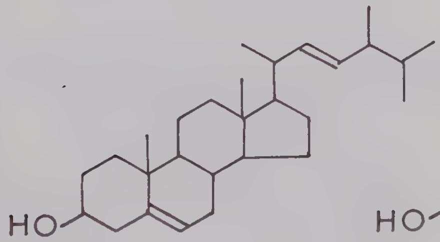
VIII



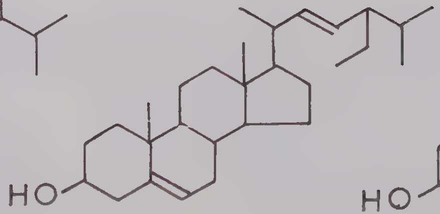
IX R = H
X R = CH_3



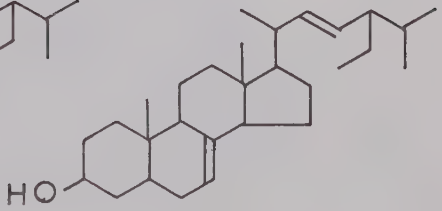
XI R = H
XII R = CH_3



XIII



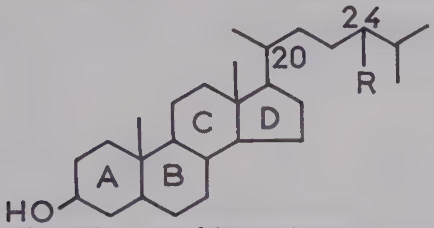
XIV



XV

ou méthyl - 24 S cholestadiène - 5,22 ol - 3 β (XIII) etc ...

On voit (Tableau II) que l'on s'écarte peu d'un stérol type possédant le squelette du cholestanol - 3 β. Les différences rencontrées concernent la position de la double liaison du cycle B, la



présence d'une insaturation supplémentaire en C - 22, la nature du groupe alcoyle en C - 24, enfin la stéréochimie en 20 et en 24.

Deux faits importants méritent d'être mentionnés : si chez les protozoaires et chez les invertébrés s des alcoyl - 24 stérols ont été rencontrés (clionastérol (éthyle - 24 S cholestérol) dans les éponges, méthylène - 24 cholestérol (IX) dans l'huître, etc... (5)), il ne semble pas y avoir d'alcoyl - 24 stérol chez les vertébrés.

Par contre, le cholestérol, que l'on croyait être un stérol spécifiquement animal, est présent en faibles quantités dans la plupart des végétaux (6,7, 44) ; dans certains cas (pollen de la porcelle (8), Algues rouges (9)), il est présent en quantités très importantes.

Notons par ailleurs que de nombreux végétaux accumulent divers dérivés stéroliques : sapogénines stéroïdes, glucosides cardioactifs, alcaloïdes stéroïdes, Ecdysone et dérivés. Il s'agit là de formes particulières du métabolisme du cholestérol.

L'étude de la biosynthèse des stérols a été effectuée principalement sur des tissus animaux. Ces derniers pouvaient en effet se prêter plus commodément à ce genre d'étude par leur haute activité synthétique ; d'autre part, l'existence, à côté du cholestérol, de substances à squelette stéroïdique et à très haute activité physiologique, chez les animaux, telles que les hormones sexuelles ou corticosurrénales, a puissamment stimulé les recherches sur le métabolisme et la biosynthèse de ces substances. Rappelons en passant que la progestérone (10), la prégnénolone (11) ainsi que l'oestrone (12) ont été récemment

TABLEAU III

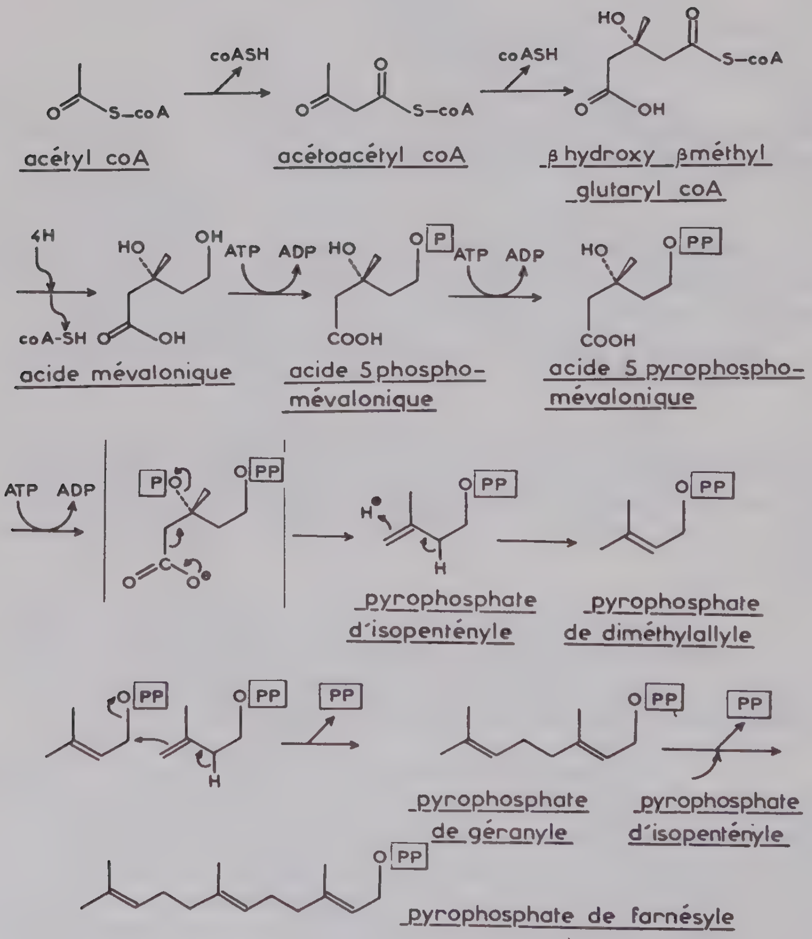
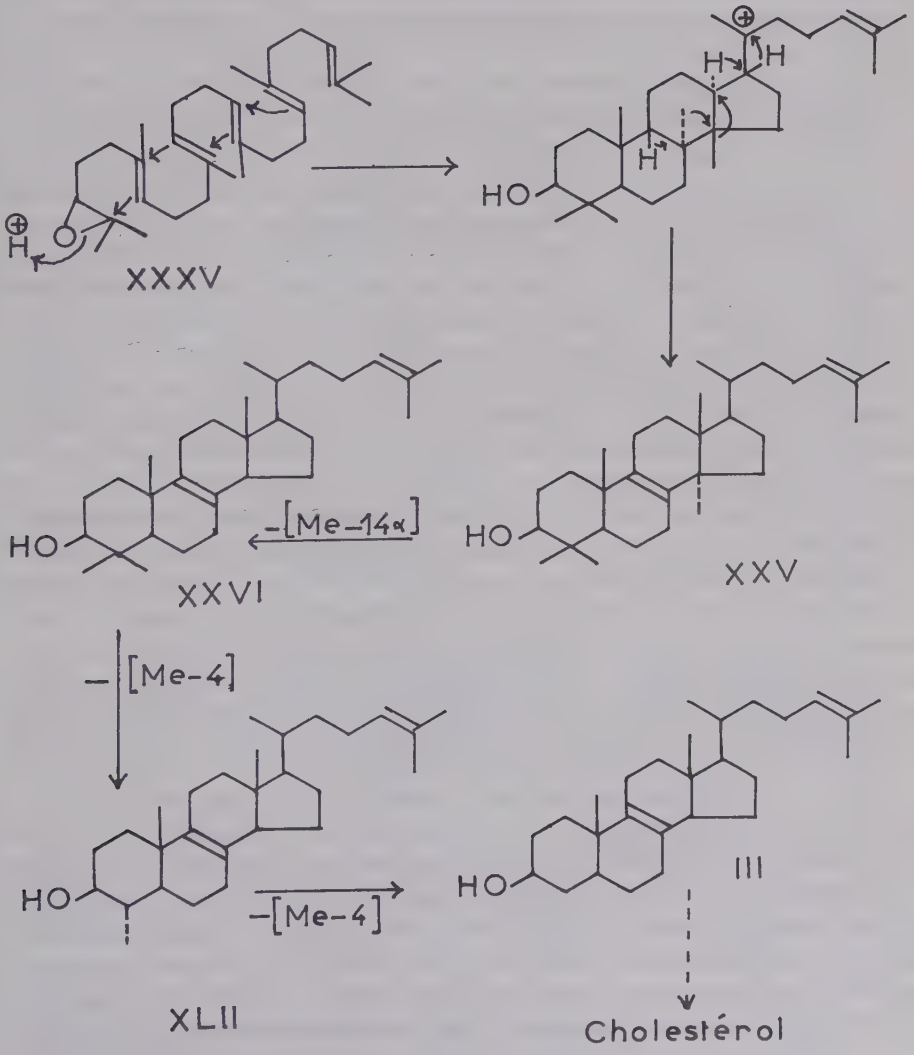

coASH
coASH
S-coA
acétyl coA
acétoacétyl coA
β hydroxy β méthyl glutaryl coA
4H
coA-SH
ATP ADP
acide mévalonique
acide 5 phospho-mévalonique
acide 5 pyrophospho-mévalonique
pyrophosphate d'isopenténylе
pyrophosphate de diméthylallyle
pyrophosphate de géranyle
pyrophosphate d'isopenténylе
pyrophosphate de farnésyle

TABLEAU III [suite]

2 pyrophosphate de farnésyle ⟶ squalène XXXIV ⟶



identifiées chez les plantes.

Les étapes conduisant de l'acide acétique au cholestérol ont été déterminées grâce à l'identification de toute une série d'intermédiaires et grâce à la transformation de ces derniers en cholestérol <u>in vivo</u> et <u>in vitro</u>. L'ensemble des travaux de BLOCH, CORNFORTH, POPJAK et LYNEN (13, 14, 15) est résumé très brièvement dans le Tableau III. Ce schéma biosynthétique a été déjà très longuement discuté et nous ne reviendrons pas sur la manière dont il a été établi ; il constituera en quelque sorte la base sur laquelle est fondé notre travail. Nous devons cependant nous pencher sur trois points importants qui ont fait l'objet d'études récentes et qui méritent une discussion.

* La transformation du squalène en lanostérol était considérée jusqu'à ces derniers mois comme un processus de cyclisation oxydatif induit par l'équivalent biochimique d'un ion OH^+. Van TAMELEN et coll. (16) ainsi que COREY et coll. (17) ont récemment montré que l'époxyde - 2 : 3 de squalène (XXXV) Tableau III, substance synthétisée auparavant dans le laboratoire de van TAMELEN (18), est métabolisée activement par un homogénat de foie de Rat. En anaérobiose, on obtient du lanostérol ; en aérobiose, on obtient du cholestérol. De plus, ces auteurs ont isolé l'époxyde - 2 : 3 de squalène dans leur matériel. La convergence des observations de ces deux auteurs permet d'ajouter un nouveau maillon à la chaîne biosynthétique conduisant au cholestérol. La transformation du squalène en lanostérol se fait donc, au minimum, en deux étapes : la première, oxydative, correspond à l'oxydation du squalène en époxyde - 2 : 3 de squalène; la seconde, non oxydative, correspond à la cyclisation de l'époxyde de squalène. C'est ainsi que BLOCH et coll. (22) ont solubilisé très récemment, à partir de microsomes de foie de Rat, une enzyme capable d'effectuer <u>in vitro</u> la conversion de l'époxyde de squalène en lanostérol.

Ainsi, le véritable substrat de la cyclisation dans le foie de Rat est l'époxyde - 2 : 3 de squalène ; rappelons que cette transformation exige de la part de l'époxyde de squalène une <u>conformation</u> déterminée : chaise, bateau, chaise, bateau (23), une <u>configuration</u> probablement déterminée en trois (21), et obéit à des facteurs stéréoélectroniques rigoureux. Cette conformation et ces facteurs, imposés et contrôlés par un système enzymatique, détermineraient la <u>structure</u> et la <u>stéréochimie</u> du lanostérol (24). D'autres conformations seraient

nécessaires pour l'obtention, à partir du même époxyde de squalène, des triterpènes tétracycliques et pentacycliques (24, 23). Notons en passant que dans la levure, les choses semblent se passer autrement : en effet, BARTON et coll. ont réalisé la transformation du lanostadiène en ergostérol dans ce matériel ; ce résultat implique que la cyclisation du squalène est un processus induit par l'équivalent biochimique d'un ion H^+, donc un processus non oxydatif conduisant au lanostadiène (25) ; ce dernier serait ensuite hydroxylé en 3 β pour donner le lanostérol.

** La transformation du lanostérol en cholestérol dans le foie de Rat implique, dans l'ordre, la perte du méthyle en 14, celle des deux méthyle en 4, puis la "migration" de la double liaison 8 (9) en 5 et la réduction de la chaîne latérale. Cependant, l'ordre dans lequel se font ces transformations pourrait ne pas être absolument rigide : c'est ainsi que récemment, le méthyl - 14 α cholestène - 7 ol 3 β a été activement transformé en cholestérol par un homogénat de foie de Rat (26), observation qui indique que l'ordre des déméthylations pourrait ne pas être rigoureusement déterminé (44). A partir du zymostérol (III), ce manque de spécificité devient encore plus net et il semble qu'il puisse exister simultanément plusieurs voies métaboliques conduisant au cholestérol. Tout se passe donc comme si des systèmes enzymatiques différents (ou des parties différentes d'une même enzyme) étaient indépendamment responsables de la perte des méthyles en 4 et 14, de la réduction de la chaîne latérale et de l'isomérisation de la double liaison nucléaire.

Ce schéma biosynthétique a été établi grâce à des travaux effectués sur le foie de Rat. Pendant le même temps, des travaux analogues étaient effectués sur la levure (27, 28) ; la même série d'intermédiaires était trouvée, du moins jusqu'au zymostérol (III). En particulier, c'est dans la levure que l'isolement pondéral et la détermination de la structure du diméthyl - 4,4 cholestadiène - 8(9), 24 ol - 3 β (XXVI) ont pu être réalisés (29). A partir du zymostérol interviendrait selon BLOCH (28) la méthylation de la chaîne latérale. Cette réaction, ainsi que la transformation du système diénique dans le cycle B, conduiraient finalement à l'ergostérol. Cependant, des divergences importantes existent sur ce dernier point; en effet, AKHTAR a démontré la conversion in vitro du méthylène - 24 lanostérol (XXVII) en ergostérol par un système acellulaire de levure (30) ; quoique

PONSINET n'ait pas décelé la présence d'intermédiaires méthylés dans la levure (29), on peut se demander cependant si la méthylation de la chaîne latérale n'interviendrait pas au niveau du lan stérol ; on pourrait alors en conclure que l'alcoylation de la chaîne latérale serait due à un système enzymatique indépendant de ceux qui réalisent les transformations précédemment décrites. Ceci est d'autant plus probable que divers triterpènes tétracycliques d'autres séries (euphorbol, alnincanone, 85) (XLIII) (carnaubadiol, 86, etc...), possèdent des groupes alcoyles en C - 24.

Le schéma biosynthétique résumé sur le tableau a été tout naturellement extrapolé à tous les organismes capables de synthétiser des stérols, et notamment aux végétaux supérieurs. Cette extrapolation se justifie dans une large mesure. L'ensemble des transformations que nous avons passées en revue font en effet intervenir des enzymes dont les exigences stéréoélectroniques sont telles que l'on peut difficilement imaginer l'existence d'une déviation métabolique. Sinon, d'importantes modifications devraient se manifester. Or, nous avons vu que les stérols des plantes sont, en ce qui concerne le squelette tétracyclique, identiques aux stérols des animaux et la <u>présence du cholestérol</u> dans de nombreuses espèces montre que, si le point de départ (acide mévalonique) est commun aux deux règnes, le point d'arrivée (cholestérol) peut l'être également.

Ce raisonnement a, en outre, été appuyé par certaines expériences que nous avons relevées dans un travail antérieur (31). D'autres expériences, effectuées depuis lors, n'ont fait que confirmer ce point de vue. Citons celles de BATTERSBY (32) qui a montré que la distribution de la radioactivité dans le β - sitostérol extrait de <u>Rauwolfia serpentina</u> est conforme aux prévisions fondées sur le schéma précédent. De même BENNETT et HEFTMANN (33) ont démontré la conversion <u>in vivo</u> du squalène ^{14}C en β - sitostérol par des graines de <u>Pharbitis nil</u>. Plus récemment, GOODWIN et coll. (34), incubant des plantules de pois en présence d'acide mévalonique (2 - ^{14}C, 4 R - ^{3}H), ont montré que le rapport $^{14}C/^{3}H$ est de 5/3 dans le β - sitostérol isolé, c'est-à-dire le même que celui du cholestérol dans le foie. Cette observation prouve que :

- les réactions catalysées par la diméthylallyl - et la géranyl - transférases et conduisant au pyrophosphate de farnésyle se font, comme dans le foie de Rat (35), d'une façon stéréospécifique et impli-

quent l'élimination de l'hydrogène 4 S de l'acide mévalonique.

- les réactions correspondant à la cyclisation du squalène et à la conversion de l'intermédiaire triterpénique formé en stérols font intervenir, comme dans la biosynthèse du cholestérol, l'élimination de trois protons et des migrations d'hydrure probablement très voisins (36).

Enfin, l'époxyde - 2 : 3 de squalène (XXXIV) est également présent dans les plantes. En effet, nous avons récemment démontré sa présence dans les tissus de Tabac cultivés <u>in vitro</u> (19). Presqu'en même temps, W.W. REID a fait la même observation sur la plante entière ; de plus l'usage d'un inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol lui a permis d'accumuler l'époxyde de squalène dans son matériel (20) et ainsi de démontrer l'intervention de cette substance dans la biosynthèse des stérols. Enfin, signalons la présence de l'époxyde de squalène dans les latex d'Euphorbe (75), milieux qui, rappelons-le, synthétisent des triterpènes tétracycliques (cycloarténol, euphol) et pentacycliques variés.

Cependant, en dépit de tous ces résultats, de nombreuses questions restent posées. En effet, au moment où nous avons entrepris ce travail, le problème de la biosynthèse des stérols des végétaux n'avait jamais été abordé avec un état d'esprit comparable à celui qui permît d'élucider la biosynthèse du cholestérol dans le foie de Rat. Des <u>marquages longs</u> avaient été utilisés, ce qui, évidemment, n'avait permis de travailler qu'au niveau des produits d'accumulation (phytostérols, triterpènes pentacycliques). En fait, aucune étude dynamique permettant de déceler les intermédiaires biosynthétiques, en particulier les intermédiaires triterpéniques, n'avait été effectuée. L'identité de ces intermédiaires avec ceux de la chaîne métabolique du foie de Rat était-elle donc évidente ? Les deux observations suivantes semblent prouver le contraire :

- nous avons vu que la présence d'un ou de deux carbones supplémentaires en C - 24 (tableau II) est un phénomène général chez les stérols des plantes. Ce groupement provient d'une réaction de transméthylation. Le mécanisme de cette dernière a fait l'objet de très nombreux travaux (37 à 40). On peut se demander si cette réaction est indépendante de la biosynthèse du squelette tétracyclique ou si, au contraire, elle se situe à une étape bien définie et contrôle une par-

tie de cette biosynthèse.

- d'autre part, l'isolement de toute une série de triterpènes tétracycliques différents du lanostérol dans les plantes (41), ainsi que la mise en évidence de produits de déméthylation inattendus de ces derniers tels que le cycloeucalénol (XXI) (42), le pollinastanol (VII) (43) ou la macdougalline (V) (44), semblait indiquer l'existence, dans les plantes, de voies cataboliques des triterpènes parallèles à celles démontrées dans le foie de Rat (44).

L'étude des voies métaboliques conduisant aux phytostérols nécessitait une adaptation des techniques de travail aux problèmes posés. L'utilisation de marquages courts, ainsi que celle d'un matériel végétal approprié à ce type de marquage, devait permettre de contribuer efficacement au but que nous nous étions fixé.

Compte tenu de ces remarques, nous avons essayé de contribuer à l'étude de la biosynthèse des stérols des végétaux en utilisant la technique des cultures de tissus de plantes. Les avantages de cette dernière technique pour les études biochimiques ont été exposés en détail précédemment (31) ; peu ou pas différenciés (45), ces tissus croissent le plus souvent sur un milieu synthétique, et toujours dans des conditions de stérilité rigoureuse. Ils forment un matériel reproductible, peu sensible aux influences saisonnières. En outre, les problèmes de pénétration de substances dont on voudrait étudier le métabolisme, et ceux de leur transfert aux sites actifs, semblent _a priori_ devoir être plus simples que dans le cas des plantes.

Nous avons fixé notre choix sur les tissus de Tabac cultivés _in vitro_. En plus des propriétés exposées plus haut, ces dernières possèdent deux particularités : d'abord, elles ont des propriétés tumorales (anergie) (45) qui les rendent insensibles aux facteurs de croissance exogènes ; enfin, elles sont capables d'héberger le Virus de la Mosaïque du Tabac, propriété qui pouvait donner lieu à d'intéressants développements de recherches.

Nous allons maintenant résumer très brièvement l'ensemble des résultats de nos travaux concernant la biosynthèse des stérols contenus dans les tissus de Tabac cultivés _in vitro_. Ces travaux ont fait l'objet d'un exposé détaillé (31). Cependant, certains résultats acquis depuis lors seront précisés de façon plus approfondie.

RESULTATS

A - *Identification et isolement de terpenoîdes*

L'étude des substances naturelles contenues en quantités suffisamment importantes pour permettre une identification au moyen de mesures physiques a d'abord été effectuée (46).

Nous avons pu extraire, purifier et identifier trois groupes de substances :

- des stérols (β - sitostérol (XII), campéstérol (XI), stigmastérol (XIV))
- des méthyl - 4 stérols (méthylène - 24 lophénol (XVII), éthylidène - 24 lophénol (XVIII))
- des diméthyl - 4,4 stérols (cycloarténol (XXXI), méthylène - 24 cycloartanol (XXXII))

Le tableau IV donne les proportions de ces substances ainsi que leurs points de fusion :

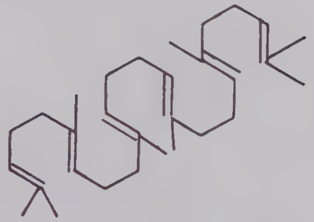
TABLEAU IV

	Poids *	F	F de l'acétate
Phytostérols (campestérol, stigmastérol sitostérol)	150 mg		136°
Cycloarténol	10 mg	-	127 - 129°
Méthylène-24 cycloartanol	4 mg	-	122°
Méthylène - 24 lophénol	4 mg	-	-
Ethylidène-24 lophénol	6 mg	162 - 164°	141 - 143°

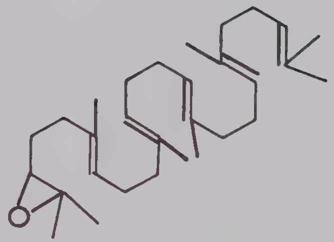
* pour 100 grammes de tissus lyophilisés

TABLEAU V

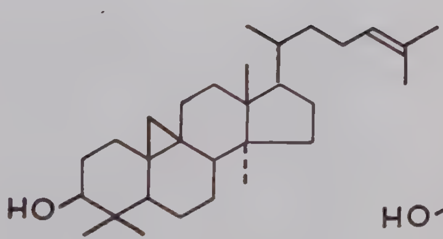
Triterpènes et stérols isolés des tissus de Tabac cultivés <u>in vitro</u>



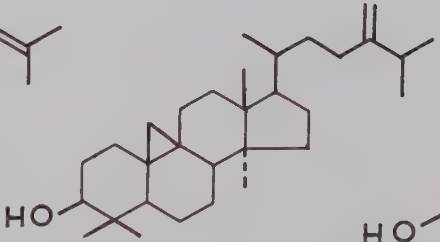
XXXIV



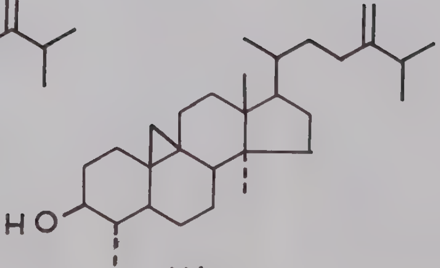
XXXV



XXXI

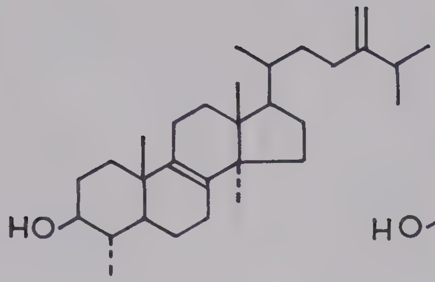


XXXII

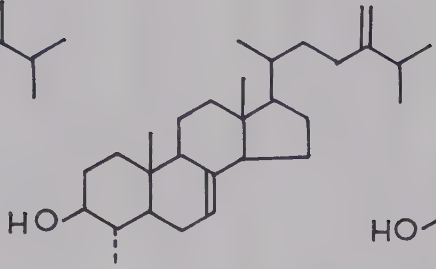


XXI

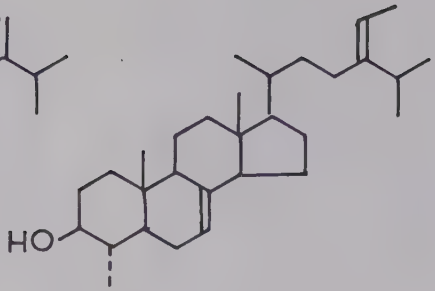
TABLEAU V [suite]



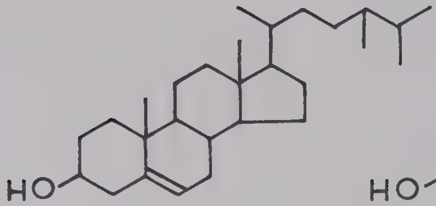
XXIV



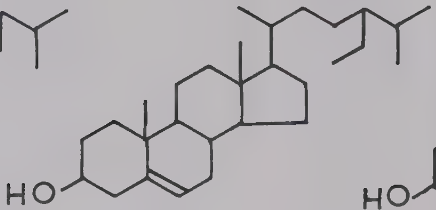
XVII



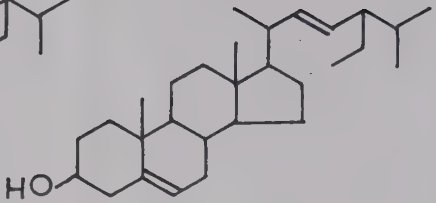
XVIII



XI



XII



XIV

Les remarques suivantes doivent être faites :

- le solanésol, prénol en C_{45} isolé des feuilles de Tabac où il s'accumule (47) , n'a pu être mis en évidence.

- les tissus de Tabac cultivés in vitro sont relativement riches en "phytostérols" et représentent un matériel convenable pour l'étude de leur biosynthèse. La présence de quantités beaucoup plus faibles de triterpènes tétracycliques, ainsi que de triterpènes tétracycliques partiellement déméthylés, peut suggérer une participation de ces dernières substances à la biosynthèse des phytostérols. Pour vérifier cette hypothèse, l'emploi des éléments marqués s'imposait.

B - Utilisation des éléments marqués

Nous avons utilisé l'acide acétique 1 - ^{14}C. Des durées d'incubation comprises entre cinq minutes et douze heures ont été utilisées (48). Les durées de l'ordre de 30 minutes se sont avérées les plus favorables à la mise en évidence des principaux phénomènes.

Nous avons pu ainsi obtenir une série de résultats :

- nous avons pu constater le marquage de l'ensemble des substances citées plus haut, en particulier celui, intense et rapide, du cycloarténol.

- nous avons identifié de nouvelles substances à renouvellement rapide qui n'avaient pu être décelées pondéralement : c'est ainsi que d'une part, le squalène (XXXIV), l'époxyde - 2 : 3 de squalène (XXXV) (19) et d'autre part le cycloeucalénol (XXI) et l'obtusifoliol (XXIV) ont pu être identifiés (49) (Tableau V).

- nous avons établi l'ordre de marquage de l'ensemble de ces substances. Le squalène et l'époxyde de squalène se marquent en premier ; ils sont immédiatement suivis par les triterpènes cyclopropaniques ; puis on assiste au marquage des méthyl - 4 stérols et enfin à celui des stérols proprement dits. Cet ordre est entièrement conforme à ce que l'on était en droit d'attendre.

- nous avons pu observer le renouvellement total du squalène et celui, partiel, des triterpènes tétracycliques (48, 50).

- lors d'incubations en anaérobiose (48), nous avons observé une impressionnante accumulation de squalène ainsi que l'inhibition to-

tale de la biosynthèse des phytostérols.

- enfin et surtout, nous avons analysé avec précision la fraction triterpénique. Malgré l'utilisation de conditions d'incubations optimales ainsi que d'un précurseur d'activité spécifique maximale, aucune trace de lanostérol et de méthylène - 24 lanostérol (XXVII) n'a pu être decelée. De même, d'autres dérivés qui auraient pu "représenter" le lanostérol ont été recherchés : le lanostadiène-8,24, et la lanostadiène - 8,24 one - 3 n'ont pu être decelés (50).

-=-=-=-=-=-

DISCUSSION

L'ensemble des substances identifiées dans notre matériel figure sur le tableau V .

Notre discussion portera d'abord sur la nature des substances identifiées dans les trois groupes suivants : stérols, méthyl - 4 stérols et diméthyl - 4,4 stérols.

Ces considérations nous amèneront à proposer plusieurs schémas biosynthétiques en accord avec nos résultats expérimentaux.

Enfin, l'ensemble des problèmes posés par ce travail nous amènera à reconsidérer les techniques utilisées, ce qui nous conduira à la deuxième partie de notre travail.

A - Les stérols

Les substances identifiées dans la fraction stérolique (campestérol, stigmastérol et β - sitostérol) forment plus de 95 % des stérols totaux. La spectrométrie de masse permet de déceler un constituant mineur dont la masse correspond à celle du cholestérol.

En fait, on doit s'attendre à ce que, en plus des stérols principaux, énumérés ci-dessus, qui marquent probablement l'aboutissement du métabolisme que nous étudions, la fraction stérolique contienne un certain nombre de stérols mineurs, à renouvellement rapide, intermédiaires probables de la biosynthèse des stérols majeurs. En effet, à partir des méthyl - 4 stérols isolés dans notre matériel, on peut se représenter plusieurs voies biosynthétiques également probables a priori aboutissant aux phytostérols (tableau VI).

La distinction entre ces voies biosynthétiques dépend de l'ordre dans lesquelles se font :

TABLEAU VI

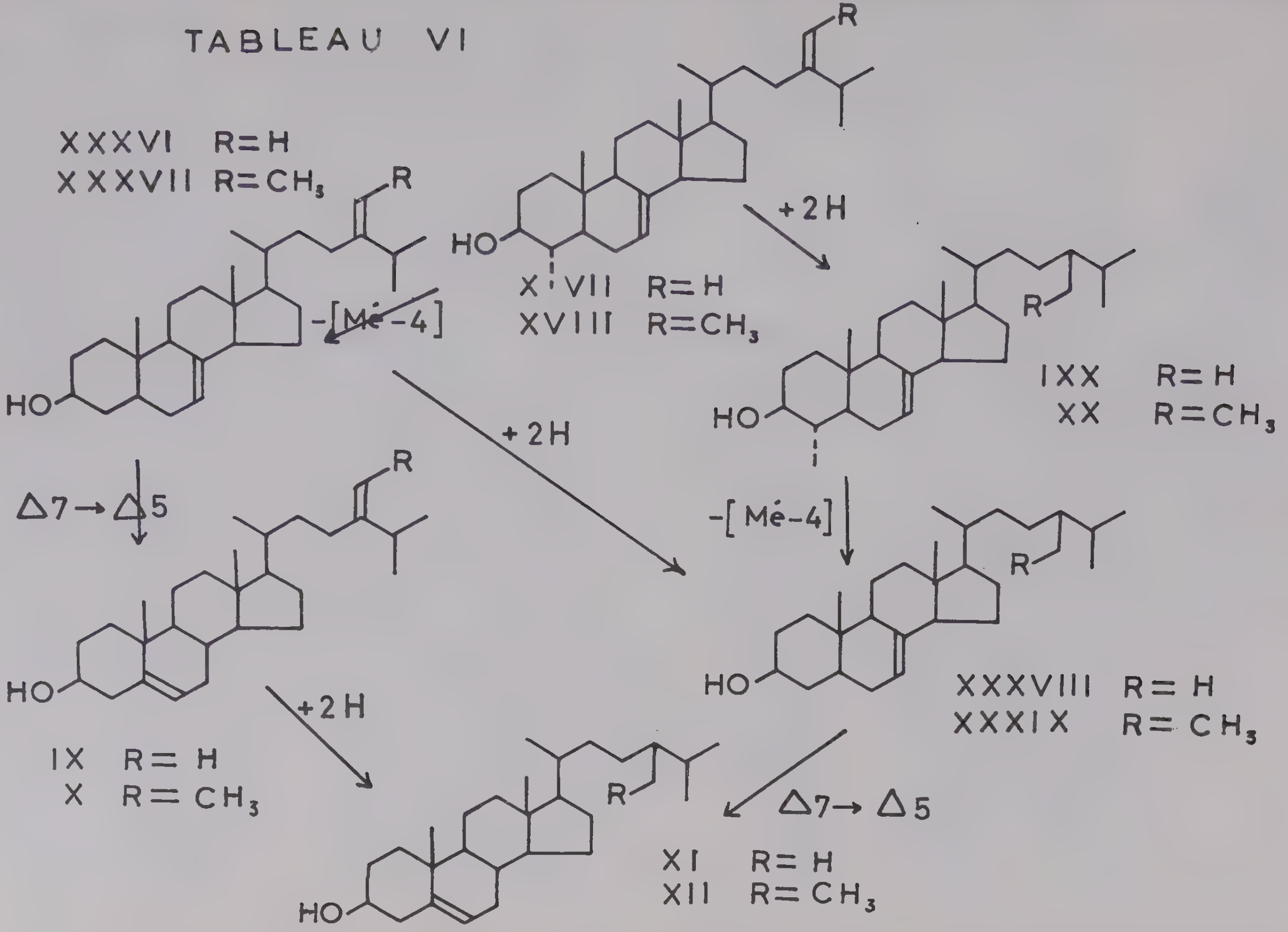
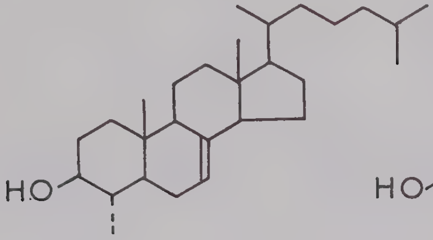
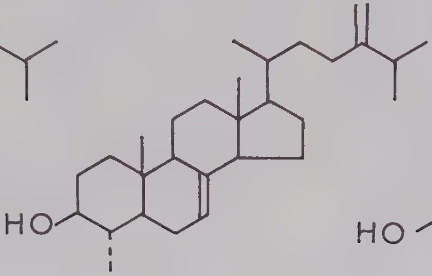

XXXVI R=H
XXXVII R=CH₃
R
HO
X VII R=H
XVIII R=CH₃
+2H
-[Mé-4]
IXX R=H
XX R=CH₃
+2H
Δ7→Δ5
-[Mé-4]
IX R=H
X R=CH₃
XXXVIII R=H
XXXIX R=CH₃
+2H
Δ7→Δ5
XI R=H
XII R=CH₃

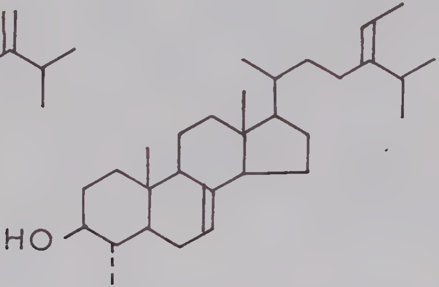
TABLEAU VII Méthyl-4 stérols



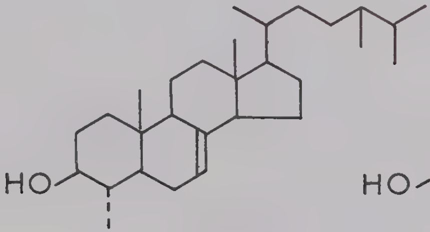
XVI



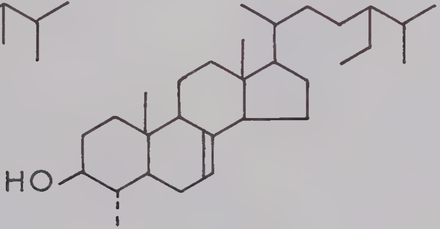
XVII



XVIII



IXX



XX

- la perte du dernier méthyle en 4
- la"migration" de la double liaison de 7 en 5
- l'hydrogénation de la chaîne latérale

L'ordre dans lequel s'effectuent ces reactions semble peu spécifique dans le foie de Rat (15). Malgré l'absence d'un travail expérimental poussé dans ce domaine, on peut, a priori, penser qu'il doit en être de même chez les plantes. On pourrait donc s'attendre à trouver dans la fraction stérolique l'ensemble des substances mises en jeu dans le schéma biosynthétique du tableau VI . Ces substances existent probablement à des concentrations très faibles, mais une analyse en radioactivité de la mixture stérolique permettrait de les déceler en particulier.

Enfin, la recherche du desmostérol (II) doit également être entreprise. Sa présence prouverait en effet l'existence d'une voie métabolique parallèle, conduisant probablement au cholestérol.

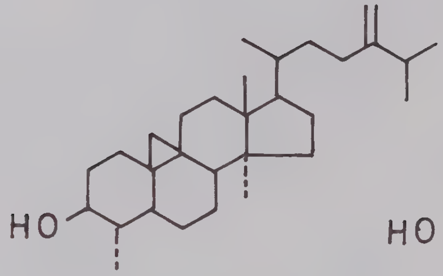
B - Les méthyl - 4 stérols

La présence du méthylène - 24 lophénol (XVII) et de l'éthylidène - 24 lophénol (XVIII) constitue un résultat intéressant (tableau VII) ; ces substances correspondent à la perte de deux méthyles par un intermédiaire triterpénique. Au moment de leur identification dans notre matériel, leur présence n'avait été signalée que dans des cas isolés : pelure d'orange (51), feuilles de pomme de terre (52). Depuis lors, ils ont été signalés dans de très nombreuses espèces et leur présence va de pair avec celle du cycloarténol et des phytostérols : GOODWIN et coll. (53 à 55) les ont identifiés dans les feuilles de pois, de maïs, de mélèze et de luzerne, BERGMAN et coll. dans le bouleau (56). Enfin, REID et coll. dans le Tabac (57).

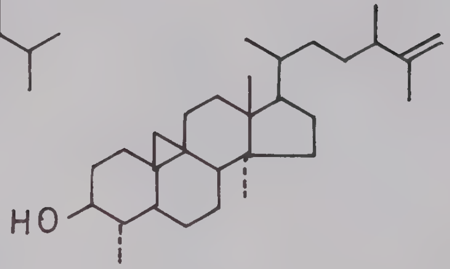
Quant au lophénol (XVI), premier méthyl - 4 stérol isolé chez des végétaux (58), il ne semble pas être présent en quantités appréciables dans notre matériel ; ceci n'a rien d'étonnant puisque le lophénol est sur la "voie" du cholestérol qui, rappelons-le, est très peu abondant dans les tissus de Tabac cultivés in vitro.

En définitive, l'existence du méthylène - 24 lophénol (XVII) et celle de son compagnon (XVIII) dans notre matériel marque

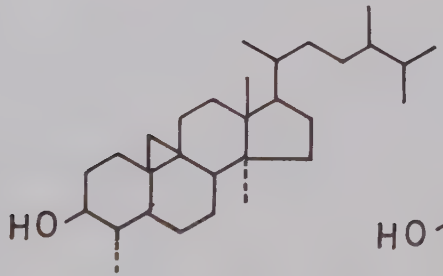
TABLEAU VIII Diméthyl-4,14 stérols



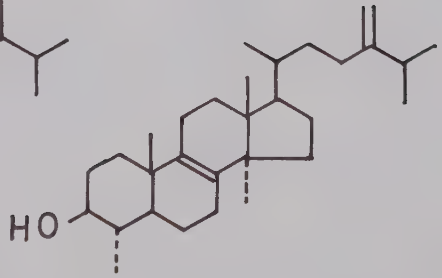
XXI



XXII



XXIII



XXIV

une étape importante dans la biosynthèse des phytostérols ; quoique leur conversion directe en phytostérols n'ait pas été démontrée, il y a tout lieu de penser qu'ils sont des intermédiaires. Les produits de leur catabolisme peuvent être l'ensemble des stérols figurant sur le tableau

Notons à ce propos que le méthyl - 24 lophénol (IXX) ainsi que l'éthyl - 24 lophénol (XX) ont été signalés par GOAD dans les feuilles de mélèze (54) ainsi que dans le pamplemousse (55).

L'analyse des méthyl - 4 stérols révèle en outre la présence d'un autre groupe de substances : ces substances correspondent à la perte d'un méthyle en 4 par un intermédiaire triterpénique. Il s'agit du cycloeucalénol (XXI) et de l'obtusifoliol (XXIV) (49).

Le cycloeucalénol pourrait correspondre à la perte d'un méthyle par le méthylène - 24 cycloartanol (XXXII). Sa présence dans notre matériel ainsi que dans le mélèze (54), l'écorce de pamplemousse (55), l'eucalyptus (42) et de nombreuses autres plantes (41) démontre l'existence d'une voie catabolique du système tétracyclique du cycloarténol.

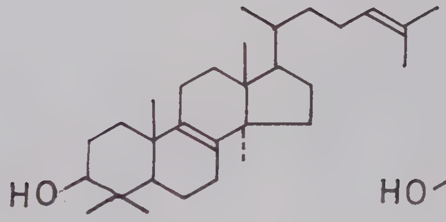
Quant à la structure de l'obtusifoliol (XXIV), elle découle de celle du cycloeucalénol par ouverture du cycle propanique. L'obtusifoliol pourrait donc être considéré comme le trait d'union entre les triterpènes tétracycliques cyclopropaniques et les méthylène - 24 et éthylidène - 24 lophénols. Nous discuterons plus loin l'importance de la présence de l'obtusifoliol dans la mise sur pieds d'un schéma biosynthétique.

C - *Les diméthyl - 4,4 stérols*

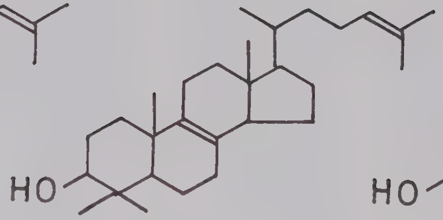
En somme, l'impossibilité de déceler le lanostérol (XXV) constitue le résultat le plus marquant de ce travail.

Notre technique analytique, fondée sur la séparation d'un groupe de substances possédant une double liaison d'avec un autre groupe possédant deux doubles liaisons, exclut également la présence dans notre fraction triterpénique du diméthyl - 4,4 cholestadiène -8(9)

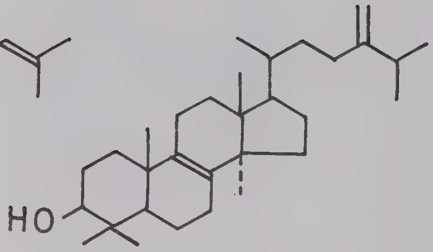
TABLEAU IX Famille du lanostérol



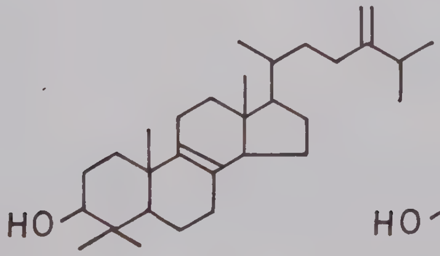
XXV



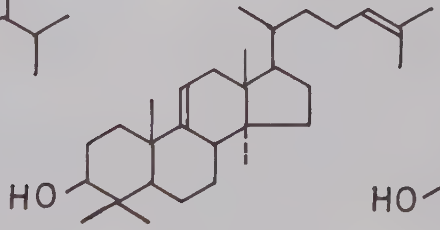
XXVI



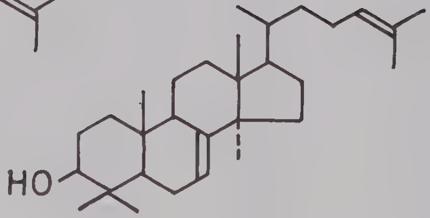
XXVII



XXVIII

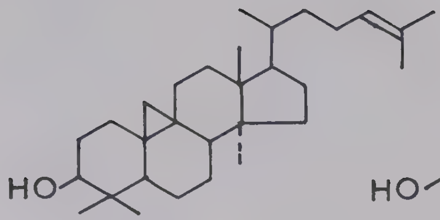


XXIX

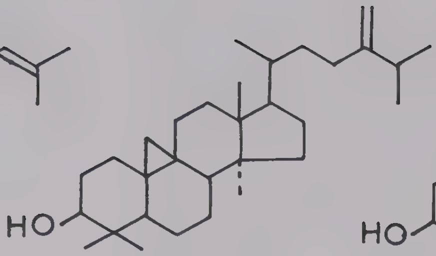


XXX

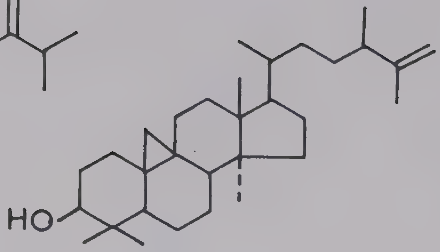
TABLEAU X Cycloarténol et compagnons



XXXI



XXXII



XXXIII

24 ol - 3 β (XXVI) qui, comme on le sait, est un produit du catabolisme du lanostérol dans la levure (29) et chez le Rat (59). Nous pouvons également penser que d'autres triterpènes possédant deux doubles liaisons, tels que le parkéol (XXIX), le méthylène - 24 lanostérol (XXVII), et le lanostadiène - 7,24 ol - 3 β (XXX) (60), sont absents dans notre matériel.

Par contre, nous identifions le méthylène - 24 cycloartanol (XXXII) et le cycloarténol (XXXI) ; cette dernière substance se marque vite (5 minutes) et très intensément lorsque les tissus de Tabac cultivés *in vitro* sont incubés en présence d'acide acétique ^{14}C. Comme sa concentration est faible (moins de 100 µg par gramme de poids sec), son activité spécifique est très importante. Il s'agit donc d'une substance ayant un renouvellement ; ceci est démontré directement par la diminution de son activité totale après une incorporation de courte durée d'acide acétique 1 - ^{14}C suivie d'un "chassage" par de l'acide acétique non radioactif.

L'ensemble de ces résultats pouvait être une particularité des tissus de Tabac cultivés *in vitro* ; cependant un travail analogue a été effectué sur la plante (61), puis sur des tissus cultivés *in vitro* de Dioscorée, d'Agave, d'Endive, de Ronce et de Carotte (61). Des résultats identiques ont été obtenus.

Pendant le même temps, des résultats analogues parvenaient d'autres laboratoires ; ainsi, REID et coll. (57) dans le cadre d'une analyse très complète des terpénoïdes de Tabac, confirmaient l'absence de lanostérol et la présence du cycloarténol et de ses compagnons. GOODWIN et coll., procédant à l'analyse en chromatographie en phase gazeuse des triterpènes tétracycliques de diverses espèces (Pamplemousse, Mélèze, Pois, etc...) ont démontré la présence de cycloarténol, de méthylène - 24 cycloartanol, mais ne sont pas arrivés à déceler le lanostérol (53 à 55).

De leur côté, SCHREIBER et OSSKE (52; 62), dans le cadre d'une investigation des terpénoïdes de *Solanum tuberosum* ont isolé et complètement caractérisé du cycloarténol, du méthylène - 24 cycloartanol , de l'éthylidène - 24 lophénol, et établi la structure du méthylène - 24 lophénol.

Il y a entre l'ensemble des travaux cités ci-dessus et les nôtres des convergences impressionnantes en dépit de la variété des matériels utilisés.

Cependant, NICHOLAS et coll. (63) ainsi que NES et coll. (64) ont observé des phénomènes légèrement différents (il est vrai que la présence, dans leur matériel, de quantités importantes de triterpènes pentacycliques (taraxastérol, β - amyrine) constitue un sérieux handicap pour l'analyse fine de la fraction triterpénique). Ainsi NICHOLAS, étudiant la fraction triterpénique extraite du pissenlit, constate la présence du cycloarténol; celle du lanostérol, tout en n'étant pas complètement exclue, s'avère très peu probable (63). NES ne décèle jusqu'à présent ni cycloarténol, ni lanostérol dans le pois en germination.

Une contribution importante à la connaissance des constituants triterpéniques des plantes a été apportée par CAPELLA et coll. (65). Ces auteurs ont démontré la présence du cycloarténol et de ses compagnons ainsi que l'absence du lanostérol dans l'insaponifiable provenant d'huiles extraites d'un très grand nombre de graines. Si l'on ajoute à ces exemples ceux des euphorbes (66), des fougères (67,68) etc... en incluant des dérivés immédiats du cycloarténol comme le cycloartanol et le nor - 31 cycloartanol, le cyclolaudénol (XXXIII) et le le nor - 31 cyclolaudenol (XXII), on peut dire que ces triterpènes cyclopropaniques ont été décelés dans toutes les espèces de végétaux chlorophylliens où ils ont été recherchés (50).

Ainsi, le cycloarténol, isolé pour la première fois par BARTON et coll. (69) (sous forme de cycloarténone) en tant que produit d'accumulation chez <u>Artocarpus integrifolia</u> peut être maintenant considéré comme le triterpène le plus universellement répandu dans le monde végétal.

Un certain nombre de questions vient alors à l'esprit:

- le cycloarténol est-il un constituant nécessaire chez les végétaux supérieurs ?

- Joue-t-il un rôle essentiel en tant que précurseur des phytostérols ? Ou bien n'est-il qu'un produit d'accumulation secondaire, une déviation inévitable mais sans signification de la biosynthèse des phytostérols ?

Avant de discuter ces derniers points, faisons les observations suivantes :

- Le cycloarténol et ses dérivés n'ont jamais été décelés chez les animaux

- Jusqu'à présent, ils ne sont pas présents chez les champignons unicellulaires (levure, etc...) (29). Le lanostérol, par contre, en a été isolé et joue un rôle d'intermédiaire (27) ; des dérivés très proches sont présents dans d'autres champignons (acides polyporéniques, etc...)

- La recherche du cycloarténol est en cours chez les algues unicellulaires (chlorelles, Euglènes).

Par contre :

- Le lanostérol a été signalé chez certains végétaux supérieurs : les tissus de rosier cultivés <u>in vitro</u> (70), l'insaponifiable d'huile de graines de café (71) et le latex de certaines Euphorbes (66). Cependant, le premier cas mentionné est maintenant mis en doute (72) et le second semble être une erreur : le cycloarténol et le méthylène - 24 cycloartanol ont été récemment identifiés dans cette source. Il ne subsiste donc que le cas de latex d'Euphorbes. Encore faut-il noter que ces derniers ne produisent pas de stérols (73) et que les tissus non laticifères produisent bien du cycloarténol.

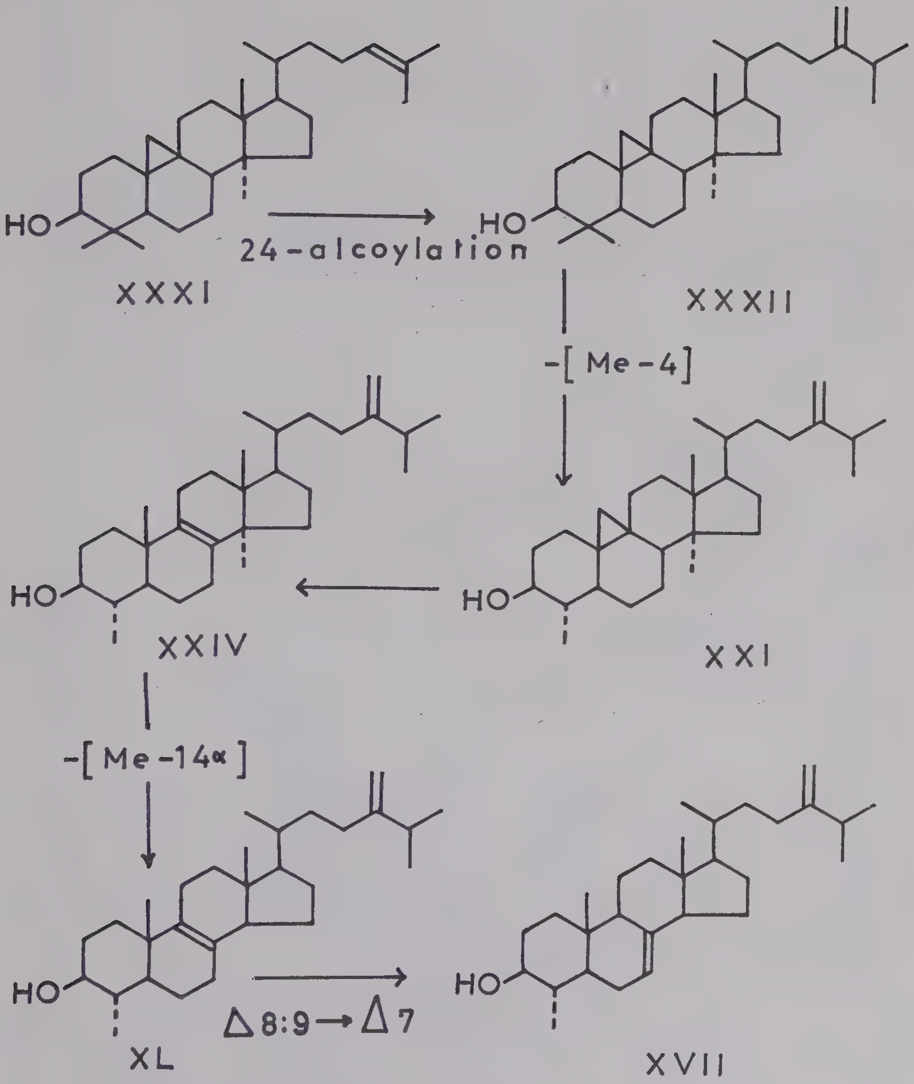
D - *Mise au point de schémas biosynthétiques*

Comment concilier l'écriture d'un schéma biosynthétique allant du squalène aux stérols avec notre incapacité à détecter le lanostérol dans notre matériel ?

1°) On peut évidemment supposer que le lanostérol est véritablement absent et que dans ces conditions, le cycloarténol joue le rôle de l'intermédiaire triterpénique dans la biosynthèse des phytostérols. Le schéma biosynthétique indiqué sur le tableau XI et proposé précédemment par GOODWIN est déduit de la structure de l'ensemble des terpénoïdes isolés dans les plantes investiguées par ces auteurs et également dans les tissus anergiés de Tabac cultivés <u>in vitro</u>.

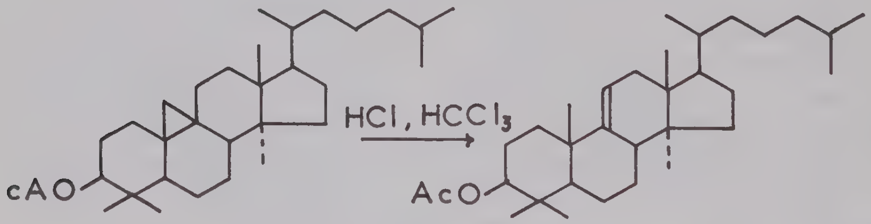
Ainsi, le cycloarténol (XXXI) serait méthylé par la

TABLEAU XI



méthionine pour donner le méthylène - 24 cycloartanol ; ce dernier perdrait un méthyle en 4 et donnerait le cycloeucalénol (XXI). A ce niveau l'ouverture du cycle propanique, réaction apparemment indispensable pour assurer la déméthylation en 14, aurait lieu et conduirait à l'obtusifoliol (XXIV). Ce dernier perdrait alors le méthyle en 14 et le méthyl - 4 ergostadiène-8 : 9, 24 : 28 ol - 3β (XL) formé pourrait donner le méthylène - 24 lophénol (XVII) par migration de la double liaison 8 : 9 en 7. La transformation de ce dernier en phytostérols est indiquée sur le tableau VI et a été discutée plus haut.

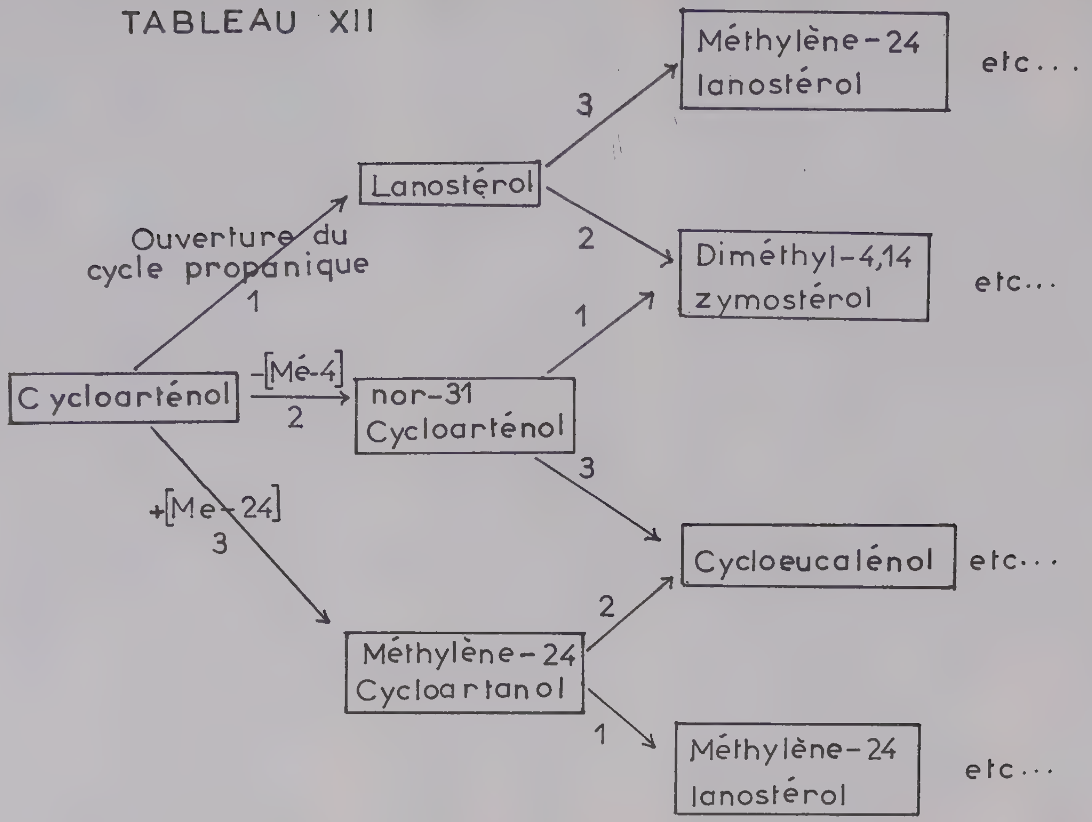
Quoique l'on ne connaisse pas d'exemples d'enzymes capables d'ouvrir un cycle propanique, l'hypothèse de l'existence de ces dernières est raisonnable, ne serait-ce que par la facilité avec laquelle les cycles propaniques en 9 : 10 : 19 des triterpènes tétracycliques sont ouverts en milieu acide (74).



Un résultat préliminaire de PONSINET (75) est particulièrement significatif à cet égard ; cet auteur est arrivé à effectuer la conversion du cycloarténol en lanostérol dans le latex d'<u>Euphorbia lathyris</u> ; la transformation inverse ne se produit pas.

Ainsi, l'ouverture enzymatique du cycle propanique 9 : 10 : 19 semble possible ; il reste cependant à déterminer à quel niveau se fait cette ouverture. Toute une série d'expériences convergentes ont amené GOODWIN et coll.,ainsi que nous-mêmes, (54,55,49) à imaginer que le substrat de cette enzyme pourrait être le <u>cycloeucalénol</u> (XXI). Cependant, il est vraisemblable que dans certains cas, le substrat de cette enzyme puisse être différent : en particulier, dans les tissus renfermant des quantités appréciables de cholestérol (pollen par exemple), le substrat de l'enzyme responsable de l'ouverture du cycle propanique pourrait être une substance apparentée au pollinastanol (VII), c'est-à-dire un triterpène tétracyclique cyclopropanique ayant perdu ses deux méthyles en 4 (43). Cette hypothèse est rendue encore

TABLEAU XII


Cycloarténol
Ouverture du cycle propanique
1
-[Mé-4]
2
+[Me-24]
3
Lanostérol
nor-31 Cycloarténol
Méthylène-24 Cycloartanol
3
2
1
3
2
1
Méthylène-24 lanostérol
Diméthyl-4,14 zymostérol
Cycloeucalénol
Méthylène-24 lanostérol
etc...
etc...
etc...
etc...

plus vraisemblable par l'isolement dans Peniocereus macdougallii , cactus contenant par ailleurs des quantités appréciables de cholestérol, de la macdougalline (V) (44), substance dont la structure découle de celle du pollinastanol par ouverture du cycle propanique et par hydroxylation en 6 α.

Comme l'a déjà souligné EHRHARDT (50), trois réactions principales interviennent dans la transformation cycloarténol - phytostérols : les déméthylations en 4, l'ouverture du cycle propanique 9 : 10 : 19 et la méthylation de la chaîne latérale. En écrivant le schéma du tableau XI , nous avons supposé une spécificité totale dans l'ordre de ces transformations, et cette hypothèse est en accord avec la structure des substances isolées pour le moment. Cependant, on ne peut pas passer sous silence l'éventualité selon laquelle les trois opérations ne seraient pas du tout spécifiques d'un substrat déterminé, ce qui conduirait à écrire une multitude de voies biosynthétiques parallèles possibles . Tableau XII .

Nous voyons donc que les apparences sont nettement en faveur d'un ou plusieurs schémas biosynthétiques faisant intervenir des intermédiaires cyclopropaniques ; cependant, en l'absence de preuves expérimentales définitives, nous devons considérer un autre schéma biosynthétique ne faisant pas intervenir des intermédiaires cyclopropaniques et cependant compatible avec la structure des substances isolées dans notre matériel.

2°) En effet, on peut imaginer que le lanostérol a un renouvellement tellement rapide qu'il n'est pas décelable en dépit de la sensibilité de nos méthodes de détection. Cette remarque est également valable pour tous les métabolites provenant du catabolisme du lanostérol et que nous ne décelons pas. Ceci dit, nous pouvons écrire un schéma biosynthétique faisant intervenir le lanostérol et compatible avec la structure des substances isolées (tableau XIII) Dans ce schéma, le lanostérol (XXV) pourrait être méthylé pour donner le méthylène - 24 lanostérol (XXVII), ce dernier pourrait perdre un méthyle en 4 pour donner l'obtusifoliol (XXIV), lequel perdrait son méthyle - 14 α pour donner la substance (XL) ; cette dernière conduirait finalement au méthylène - 24 lophénol (XVII) par migration de la double liaison 8 : 9 en 7.

TABLEAU XIII

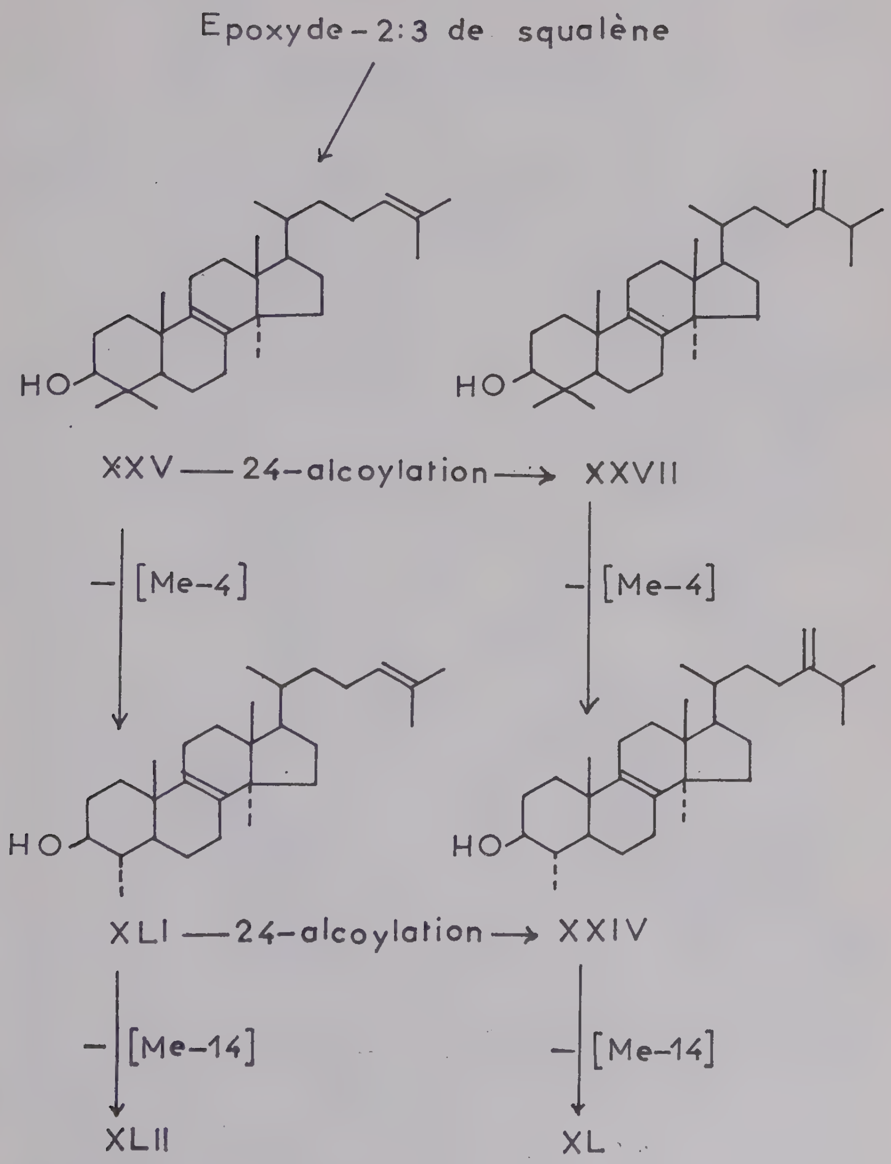


TABLEAU XIII [suite]

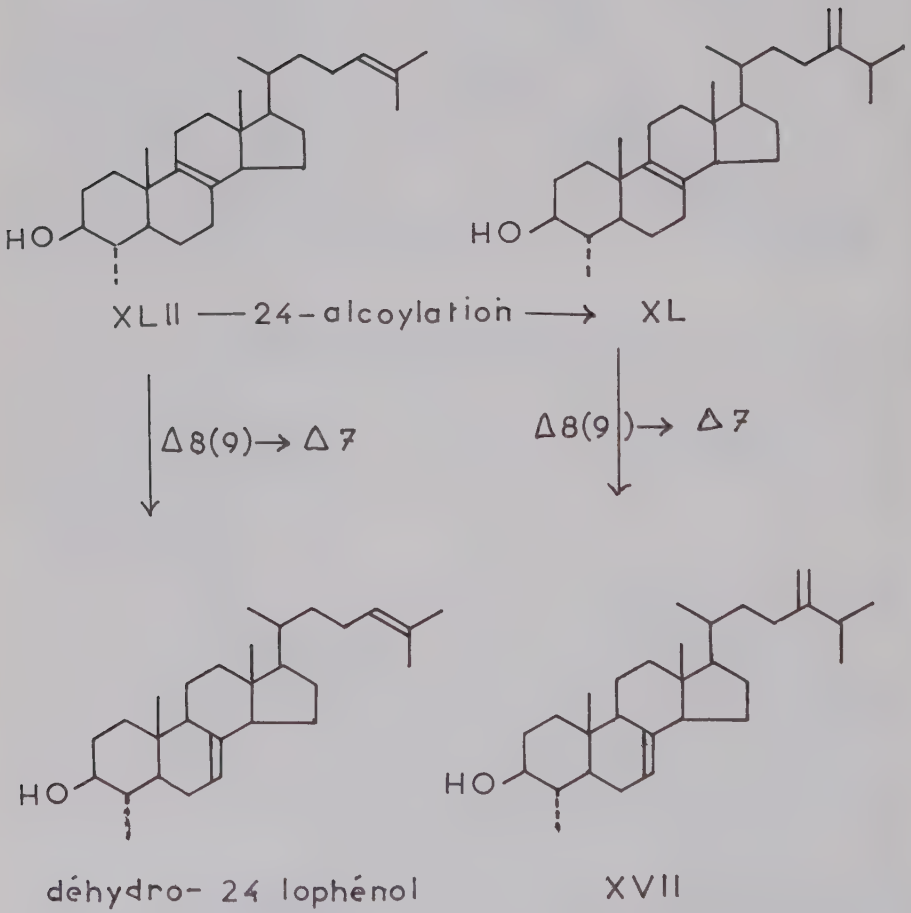
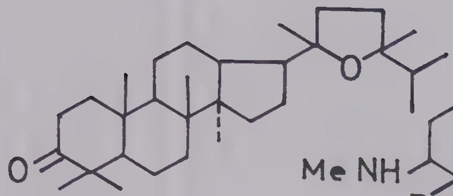
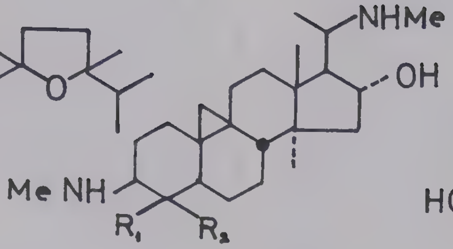


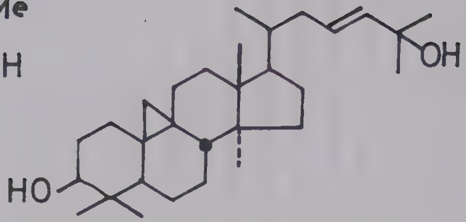
TABLEAU XIV



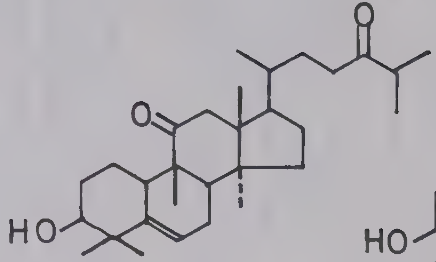
XLIII



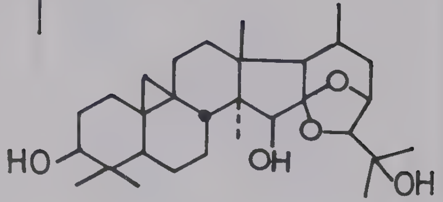
XLIV



XLV



XLVI



XLVII

Notons qu'une voie parallèle, dans laquelle le lanostérol perdrait d'abord un méthyle en 4 pour donner le diméthyl - 4,14α zymostérol (XLI), lequel serait ensuite méthylé en 24 pour donner l'obtusifoliol, est également raisonnable.

Si on adopte un pareil schéma, on doit alors se demander quel peut être le métabolisme du cycloarténol. Ce dernier a, rappelons-le, un renouvellement assez rapide. De plus, la comparaison des quantités de radioactivité incorporées respectivement dans la voie cycloarténol (activité combinée des triterpènes cyclopropaniques) et dans la voie lanostérol (activité combinée des me - 4 stérols et des stérols) montre que la voie du cycloarténol est beaucoup plus importante que la voie lanostérol (tableau XV). Ceci implique un catabolisme très actif du cycloarténol, conduisant à des substances qu'il reste encore à identifier dans notre matériel Rappelons à ce propos que le cycloarténol est considéré comme le précurseur de toute une série de substances naturelles, en particulier (tableau XIV) des alcaloïdes du Buxus (XLIII) (77), de triterpènes cyclopropaniques oxydés : cycloartène - 23 diol - 3 β, 25 (XLV) dans *Tillandsia usneoides* (78) et Cimigenal (XLVII) dans *Cimifuga racemosa* (79), et peut-être des cucurbitacines : bryogénine (XLVI) dans la bryone.

En définitive, nous proposons deux schémas : dans l'un le lanostérol (ou tout autre triterpène tétracyclique en série lanostane et possédant une double liaison nucléaire) est l'intermédiaire triterpénique ; cependant, la voie biosynthétique conduisant aux stérols présente des différences importantes avec la voie classique : d'une part, l'intervention d'intermédiaires possédant un méthylène en 24 est certaine dès les méthyl - 4,14 stérols, d'autre part, l'ordre des déméthylations y est différent : les méthyl 4, 14 et 4 sont successivement perdus.

Dans l'autre schéma, le cycloarténol est l'intermédiaire triterpénique, et dans ce cas, la voie biosynthétique comporte des différences très importantes avec la voie établie précédemment dans le foie de Rat et la levure.

Pour choisir entre ces deux schémas, une expérience s'imposait : l'incubation de tissus de Tabac cultivés *in vitro* en présence de lanostérol et de cyloarténol radioactifs.

Cette expérience, réalisée par EHRHARDT (50) a donné

les résultats suivants :

- le lanostérol ne semble pas avoir été métabolisé

- le cycloarténol a donné par deux fois un résultat positif, puisque de la radioactivité fut trouvée dans les acétates - époxydes des phytostérols. Ce résultat ne put malheureusement être confirmé quelles que soient les conditions expérimentales utilisées. Les causes de ce demi-échec proviennent de la très grande difficulté qu'éprouvent les substances lipidiques à franchir les parois cellulosiques des cellules végétales, et également du fait que les précurseurs utilisés (cyloarténol et lanostérol tritiés en C - 2) pouvaient perdre leur marquage au cours des expériences.

Cette difficulté, mise en lumière dans le cas du cycloarténol et du lanostérol, doit se reproduire inévitablement chaque fois que l'on voudra démontrer une relation biogénétique entre telle substance isolée dans notre matériel avec le β - sitostérol. Ainsi, une lacune importante existe dans notre travail : malgré les filiations biogénétiques évidentes existant entre telle ou telle substance isolée dans notre matériel, nous n'avons pas été capables d'en démontrer aucune directement. Or, la mise au point d'un schéma biosynthétique complet implique la conversion de tous les intermédiaires supposés en phytostérols.

D'autres auteurs ne semblent pas avoir connu ces difficultés. C'est ainsi que HEFTMANN et BENNETT ont effectué la conversion de squalène ^{14}C en stérols avec apparemment un excellent rendement dans les plantules de Pharbitis nil (33). Ces mêmes auteurs sont arrivés à incorporer le cholestérol - ^{14}C dans les alcaloïdes d'Holarrhena (81), dans les sapogénines à noyau stérolique de Discorea spiculiglora (82), ainsi que la prégnénolone - ^{14}C et la progestérone - ^{14}C dans les alcaloïdes d'Holarrhena et tout récemment dans les cardenolides de Digitalis lanata (83). Quoique l'on puisse émettre quelques doutes sur la rigueur d'expériences effectuées dans des conditions non stériles, surtout si un travail de dégradation chimique destiné à prouver la spécificité de la transformation n'a pas été effectué sur les produits radioactifs formés, ce type d'expériences doit être repris dans notre matériel qui, rappelons-le, présente toutes les garanties de stérilité requises.

Une autre solution consistait à supprimer la barrière

des membranes en préparant un système acellulaire capable de synthétiser *in vitro* des stérols. Cette solution a, pour le moment, été envisagée et fera l'objet d'un exposé détaillé dans la deuxième partie de notre travail.

CONCLUSION

En définitive, notre contribution la plus importante à l'avancement de la biosynthèse des stérols des plantes aura été d'avoir soulevé le problème posé par la présence constante du cycloarténol et l'absence constante du lanostérol chez les végétaux supérieurs. Indépendamment du rôle éventuel du cycloarténol dans la biosynthèse des stérols des végétaux, il est intéressant de signaler que notre premier résultat (84) a entrainé, dans notre laboratoire comme dans de nombreux autres groupes, de multiples travaux sur les triterpènes tétracycliques de différentes espèces végétales qui tous ont apporté une réponse identique : présence du cycloarténol, absence du lanostérol.

De plus, les travaux de GOODWIN et coll., confirmant en tous points nos observations, permettent de dégager une liste de substances naturelles, figurant régulièrement dans les insaponifiables de nombreuses espèces et accompagnant les phytostérols (tableau V) et qui, malgré l'absence de preuves directes, permettent de proposer un schéma biosynthétique différent de celui existant chez les animaux.

Ainsi, les tissus anergiés de Tabac cultivés *in vitro*, dans lesquels nous nous attendions à rencontrer peut-être des déviations métaboliques par rapport aux plantes intactes, se sont révélés être un matériel d'étude particulièrement représentatif en ce qui concerne l'étude du métabolisme des stérols chez les végétaux supérieurs.

Il nous faut mettre ici l'accent sur une des propriétés les plus remarquables de notre matériel : nous avons eu en effet la possibilité d'effectuer des marquages très courts (de cinq minutes à une heure) tout en ayant de fortes activités dans les substances isolées ; ceci constitue un grand avantage de ce matériel par rapport à un matériel végétal ordinaire et nous permet d'envisager la mise en route d'études cinétiques précises qui, sans aucun doute, contribueront d'une manière efficace à l'élucidation du rôle du cycloarténol dans la biosynthèse des stérols des végétaux.

PARTIE EXPERIMENTALE

La plupart des techniques utilisées pour ce travail ont été décrites précédemment (31, 50). Nous nous bornerons à décrire les techniques nouvelles.

Chromatographie en couche mince

On utilise des plaques de 20 x 20 cm. L'adsorbat (silice MERCK pour chromatographie en couche mince) est étalé manuellement à raison de douze grammes pour quarante ml d'eau distillée. On a également utilisé des plaques MERCK analytiques toutes préparées.

Le solvant de migration utilisé consiste la plupart du temps en un mélange de cyclohexane (neuf parties) et d'acétate d'éthyle (une partie). On effectue généralement deux migrations. Ces détails expérimentaux constitueront désormais "les conditions habituelles".

Les terpénoïdes sont visualisés en lumière U.V. (340 nm) après aspersion des chromatogrammes avec une solution de berbérine (1 mg/ml).

Séparation des terpénoïdes contenus dans les tissus de Tabac cultivés in vitro

L'obtention de la matière insaponifiable a été décrite précédemment (46). La matière insaponifiable est chromatographiée en couche mince dans les conditions habituelles. Les stéroïdes sont séparés en trois groupes principaux. Cette séparation est basée sur la nature du cycle A (89). Dans l'ordre des polarités croissantes, on obtient :

a - Les diméthyl - 4,4 stérols (parmi les-quels figu-

rent les triterpènes tétracycliques ainsi que les triterpènes ayant perdu un méthyle en 14) (tableaux IX , X).

b - Les méthyl - 4 stérols (parmi lesquels figurent également des triterpènes ayant perdu un méthyle en 4, mais conservant un méthyle en 14) (tableaux VII , VIII).

c - Enfin, les stérols (parmi lesquels pourraient figurer des triterpènes tétracycliques ayant perdu leurs deux méthyles en 4, mais conservant un méthyl en 14) (tableaux I , II).

Acétylations

On opère de la manière classique. Cependant, une fois la réaction terminée, on ajoute un volume d'eau, on gèle la suspension laiteuse obtenue et on lyophilise ; dans ces conditions, la récupération de l'acétate est quantitative et il y a un minimum de dégradation.

Epoxydations

Sur la figure 1, nous avons les positions occupées sur les chromatogrammes par les acétates époxydes des diméthyl - 4,4 stérols et des méthyl - 4 stérols auxquels nous avons eu affaire.

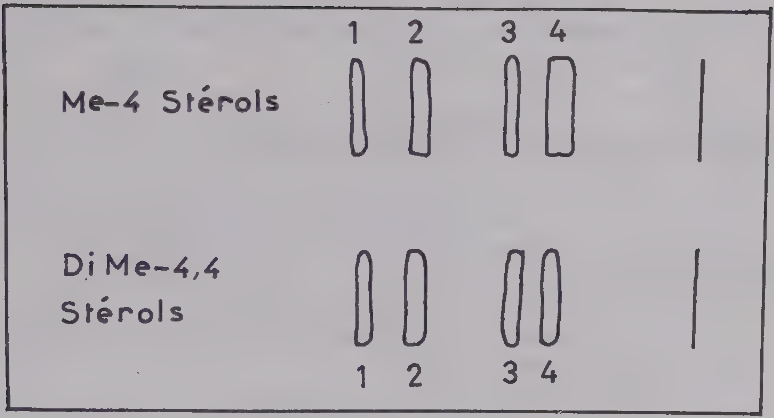
a) Diméthyl - 4,4 stérols

1 - Acétates époxydes du méthylène - 24 cycloartanol et du cyclolaudénol (XXXII et XXXIII).

2 - Acétate-époxyde du cycloarténol (XXXI)

3 - Acétate-diépoxyde du méthylène - 24 lanostérol et du nor - 29 méthylène - 24 lanostérol (XXVII et XXVIII)

4 - Acétates diépoxydes du lanostérol et du nor-28 lanostérol (XXV et XXVI). Tableaux IX , X .



<u>Fig 1:</u> *Chromatographie comparative des acétates-époxydes de méthyl-4 stérols et de diméthyl-4,4 stérols. Migration du solvant effectuée de droite à gauche.*

b) <u>Méthyl - 4 stérols</u>

1 - Acétate-époxyde du cycloeucalénol et du nor - 31 cyclolaudénol (XXI et XXII).

2 - Acétate-époxyde du lophénol (XVI)

3 - Acétate-diépoxyde de l'obtusifoliol (XXIV)

4 - Acétates-diépoxydes du méthylène - 24 lophénol (XVII) et de l'éthylidène - 24 lophénol (XVIII).

Tableaux VII , VIII .

<u>Utilisation des produits marqués</u>

Les techniques de base ont été décrites précédemment (48). Dans les expériences les plus récentes, de l'acide acétique à haute activité spécifique (40 mC/mM) a été utilisé.

Quoique l'acide mévalonique ^{14}C soit un précurseur spécifique des isoprénoïdes, il n'a pas été utilisé, du fait de son activité spécifique médiocre (5 mC/mM).

Détection et comptage des substances radioactives

La lecture de la répartition de la radioactivité sur les chromatographies en couche mince a été effectuée grâce à un lecteur BERTHOLD.

Les comptages sont faits sur un spectromètre à scintillateur liquide PACKARD.

Description de la conduite d'une expérience - type

On procède pendant soixante minutes à une incubation de douze cultures de tissus de Tabac (20 à 30 grammes de poids frais) dans un milieu contenant 200 µC (0,3 mg) d'acide acétique 1-^{14}C (48). Après extraction à l'éther de pétrole des tissus lyophilisés, on ajoute à l'extrait brut 1 mg de squalène, 1 mg de lanostérol, 1 mg de cycloarténol, 1 mg d'obtusifoliol et 1 mg d'époxyde - 2 : 3 de squalène. On saponifie le tout pendant une heure. La figure 2 indique la répartition de la radioactivité dans l'insaponifiable après chromatographie en couche mince dans les conditions habituelles. Les zones correspondant aux pics sont grattées, les substances contenues dans l'adsorbat sont éluées par l'éther. Une partie aliquote des éluats est prélevée en vue de la détermination de la radioactivité contenue dans les éluats. Dans le tableau nous avons les radioactivités de chaque groupe de substances.

TABLEAU

	Activité *
Squalène	0,54
Squalène oxyde	0,055
Diméthyl-4,4 stérols	1,01
Méthyl - 4 stérols	0,18
Stérols	0,065

* en 10^6 d.p.m.

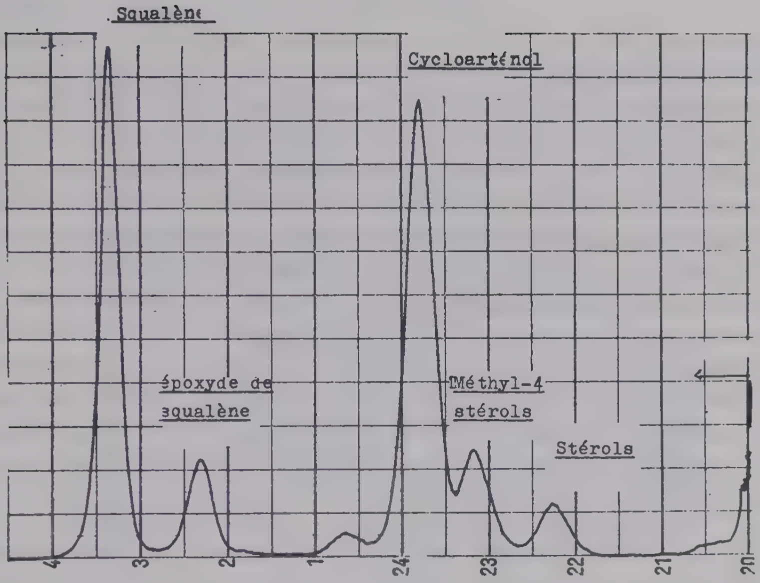


Fig 2 : *Diagramme correspondant à la lecture de la radioactivité répartie sur une chromatographie en couche mince. Il s'agit de la séparation des constituants d'un insaponifiable obtenu à partir de tissus de Tabac cultivés in vitro. En abscisse et de droite à gauche le sens de migration du solvant. En ordonnée l'intensité de la radioactivité.*

Identification de l'époxyde de squalène (19)

Sur la figure.2, on voit un pic correspondant à une substance plus polaire que le squalène. Ce pic est superposable à la bande correspondant, après révélation à l'iode, à l'époxyde-2:3 de squalène entraineur. La substance correspondant à ce pic est éluée et rechromatographiée en couche mince (5 % AcOEt dans le cyclohexane). Le pic de radioactivité est unique, symétrique et superposable à la bande obtenue après révélation à l'iode de l'époxyde de squalène entraineur (figure 3). Pour confirmer ce résultat, la substance correspondant au pic précédent est dissoute dans le dioxanne aqueux (30 % H_2O), on ajoute une goutte d'acide perchlorique N/25, et on chauffe à 90° pendant dix minutes ; dans ces conditions, l'époxyde est transformé en un diol identifié comme étant le squalène - glycol (90). Cette substance est chromatographiée en couche mince (30 % AcOEt dans le cyclohexanne) ; la substance radioactive obtenue est unique, le pic correspondant est symétrique et superposable à la bande correspondant au squalène - glycol entraineur (figure 4).

Par acétylation pyridinée, à chaud, ce glycol donne un mélange de mono et diacétates ; ces derniers sont chromatographiés (20 % acétate d'éthyle).

Identification du cycloeucalénol et de l'obtusifoliol

Les substances correspondant au pic des méthyl - 4 stérols (figure 2) sont éluées. Comme les diméthyl - 4,4 stérols sont beaucoup plus radioactifs que les méthyl - 4 stérols, on rechromatographie ces derniers avec des diméthyl - 4,4 stérols non radioactifs afin d'éliminer toute contamination due à ces derniers. Les méthyl - 4 stérols ainsi purifiés sont acétylés ; les acétates obtenus sont purifiés par chromatographie puis époxydés de la manière habituelle (44, 66). Le mélange des acétates époxydes est chromatographié en couche mince dans les conditions habituelles. On obtient le diagramme de la figure 5. Ce diagramme comporte 4 pics principaux A, B, C et D.

Le pic D correspond au mélange des acétates diépoxydes du méthylène - 24 lophénol et de l'éthylidène - 24 lophénol (XVII et XVIII).

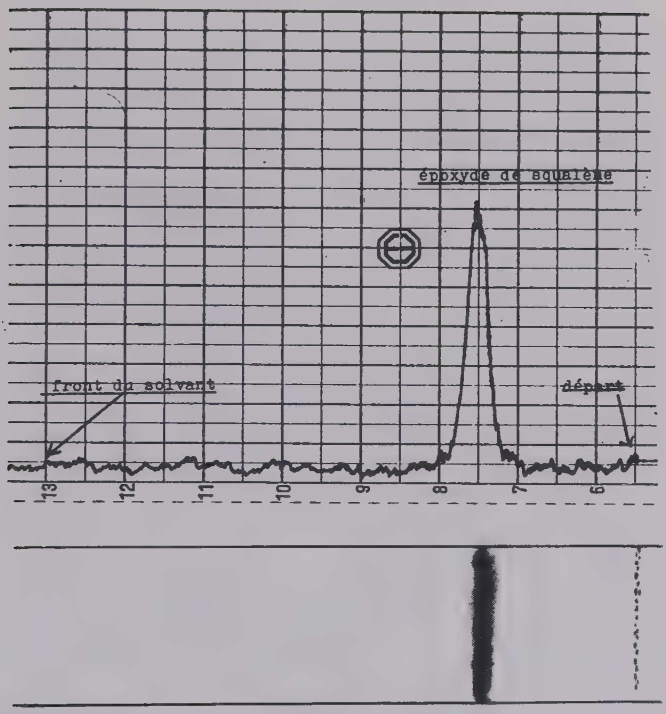


Figure 3 : *Chromatographie de l'époxyde 2 : 3 de squalène.*

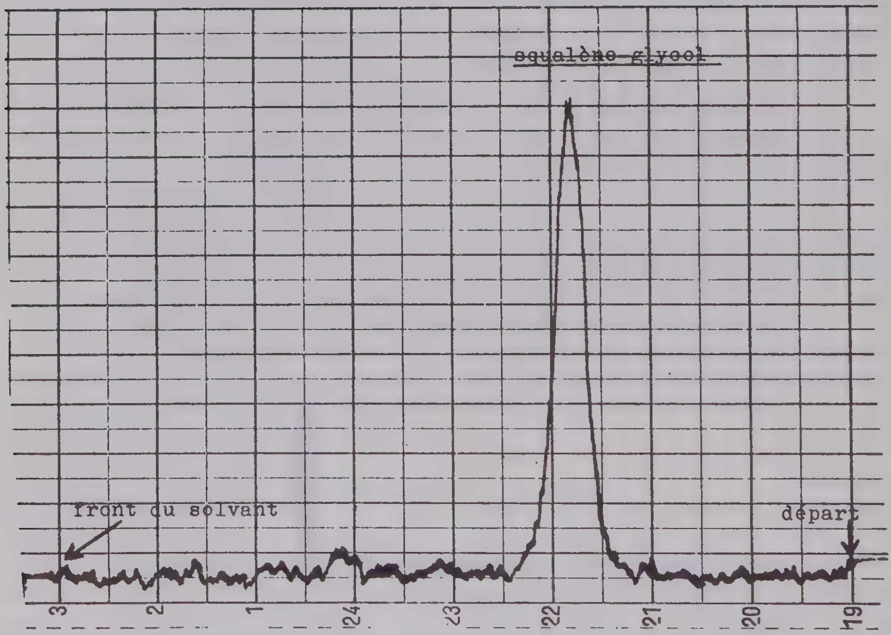


Figure 4 : Chromatographie du squalène glycol

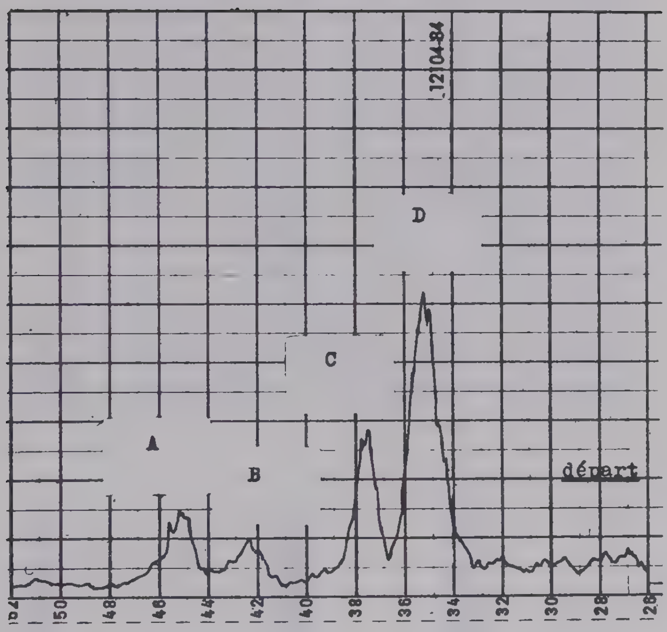


Figure 5 : *Chromatographie du mélange d'acétates d'époxydes de méthyl - 4 stérols*

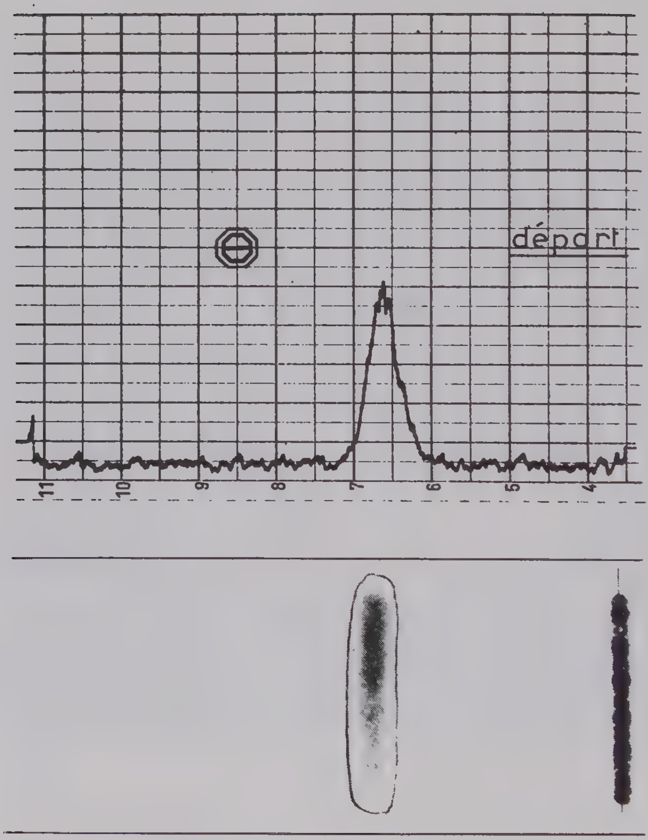


Figure 6 : *Chromatographie de l'acétate - époxyde du cycloeucalénol*

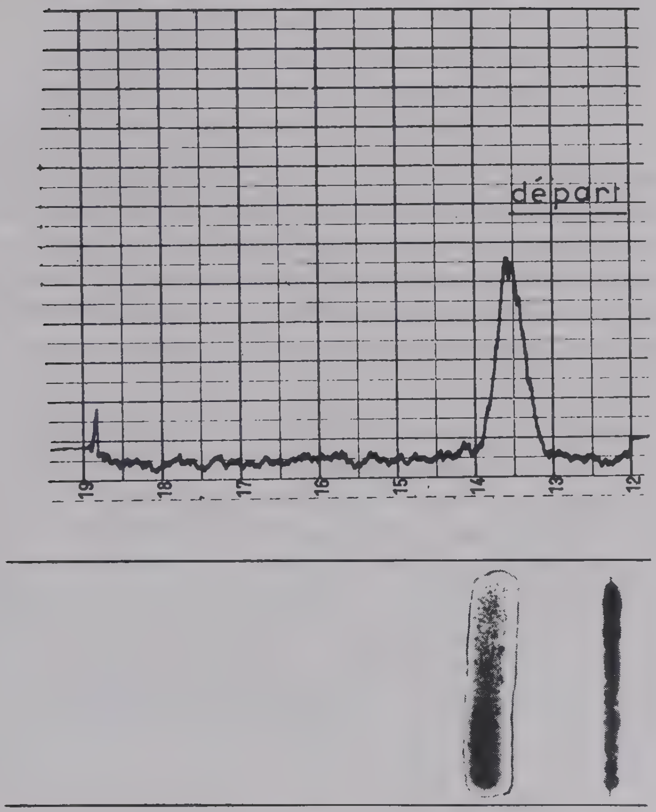


Figure 7 : *Chromatographie de l'acétate - diépoxyde de l'obtusifoliol*

Le pic B correspond à une substance inconnue. Quant aux pics A et C, ils sont respectivement chromatographiquement identiques aux acétates - époxydes du cycloeucalénol (XXI) et de l'obtusifoliol (XXIV).

a) Cycloeucalénol

L'acétate - époxyde du cycloeucalénol est rechromatographié en couche mince dans les conditions habituelles. Le pic de radioactivité obtenu est superposable à la bande correspondant au produit entraineur repéré par fluorescence après aspersion de berbérine, figure 6, ce qui prouve l'identité de la substance radioactive avec l'acétate-époxyde du cycloeucalénol. Ce dernier est élué, on ajoute 50 mg d'acétate - époxyde entraineur et on recristallise jusqu'à activité spécifique constante. Tableau XVI

TABLEAU XVI

	1ère recristallisation	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème
Activité en c.p.m./mg	121 ± 5	128	124	104	119	116

b) Obtusifoliol

L'acétate - diépoxyde de l'obtusifoliol, repéré par fluorescence après aspersion de berbérine, est élué et rechromatographié en couche mince dans les conditions habituelles. Le pic de radioactivité obtenu (figure 7) est superposable à la bande obtenue après révélation à la berbérine, ce qui prouve l'identité de la substance radioactive avec l'acétate - époxyde de l'obtusifoliol. Enfin, ce dernier est élué, on lui ajoute 40 mg d'acétate - diépoxyde froid et on recristallise à activité spécifique constante (tableau XVII).

TABLEAU XVIII

	1ère re-cristallisation	2ème	3ème	4ème
Activité en c.p.m./mg	187 ± 8	174	185	198

Analyse de la fraction des diméthyl - 4,4 stérols

On opère exactement comme dans le cas de la mixture des méthyl - 4 stérols. C'est ainsi que l'on rechromatographie la fraction des diméthyl - 4,4 stérols en présence de méthyl - 4 stérols afin d'éliminer toute contamination avec de l'obtusifoliol ou du méthylène - 24 lophénol (substances qui, rappelons - le, ont, sous forme d'acétates - époxydes, un comportement très voisin du lanostérol, figure 1). Les diméthyl - 4,4 stérols ainsi purifiés sont acétylés, et les acétates époxydés. Les acétates - époxydes de diméthyl - 4,4 stérols sont chromatographiés en couche mince dans les conditions habituelles. On obtient le diagramme de la figure 8. Sur ce diagramme figurent deux pics; de gauche à droite on a : l'acétate - époxyde du méthylène - 24 cycloartanol (XXXII) et l'acétate - époxyde du cycloarténol (XXXI). Il n'y a pas d'activité au niveau des acétates - diépoxydes.

On pourrait alors conclure à l'absence de tous les triterpènes tétracycliques contenant deux doubles liaisons, c'est-à-dire tous les produits du tableau IX . On s'est penché plus particulièrement sur le lanostérol et le méthylène - 24 lanostérol ; les bandes correspondant aux produits entraineurs ont été découpées. Les substances contenues dans la silice ont été éluées et rechromatographiées. Les substances entraineurs sont révélées grâce à leur fluorescence après aspersion de berbérine. Aucun pic de radioactivité n'est visible sur les diagrammes.

On en déduit l'absence de ces deux substances dans

notre matériel, ce qui exclut, pour des raisons évidentes, la présence des substances XXVI et XXVIII.

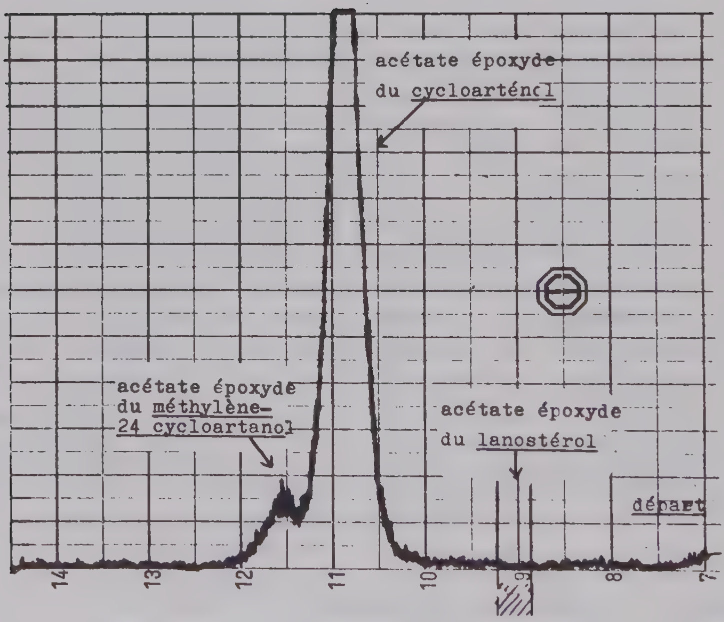


Figure 8 : *Séparation des acétates - époxydes des triterpènes contenus dans les tissus de Tabac cultivés in vitro*

Bibliographie

1. E.Heftmann, Ann. Rev. Plant Phys., 14, 225, 1963
2. L.J.Goad, Terpenoïds in plants, p. 159, Acad. Press, London, 1967
3. G.Morpurgo, G. Serluppi-Crescenzi, G.Tecce, F.Valente et D.Venetacci, La ricerca scientifica 34(2-b), 169,1964
4. J.Asselineau, Les lipides bactériens, p. 287, Hermann, Paris, 1962
5. L.F.Fieser et M.Fieser, "Steroïds", Reinhold publishing Corp., New-York, N.Y., 1959
6. D.F.Johnson, R.D.Bennett et E.Heftmann, Science 140, 198, 1963
7. M.F.Hugel, W.Wetter, H.Audier, M.Barbier et E.Lederer, Phytochem. 3, 7,1964
8. M.Devys et M.Barbier, Phytochem. 5, 1031, 1966
9. K.Tsuda, S.Akagi et Y. Kishida, Chem. pharm. Bull. Tokyo; 6, 101, 1958
   G.F.Gibbons, L.J.Goad et T.W.Goodwin, Phytochem., 6, 677, 1967
10 M.M.Leboeuf, A.Cavé et R.Goutarel, C.R.Acad. Sci. Paris, 259; 3401, 1964
11 R.Tschesche et G. Snatzke, Annal. Chem., 636, 105, 1960
12 R.D.Bennett, S.-T. Ko et E.Heftmann, Phytochem., 5, 231, 1966
13 T.T.Tchen, Metabolic pathways, p. 389, Acad. Press, N.Y., 1960
14 O.Karlström, Svensk Kemisk Tidskrift, 74, 11, 1962
15 R.B.Clayton, Quaterly Reviews, 19(2), 168, 1965
16 E.E.van Tamelen, J.D.Willett, R.B.Clayton et K.E.Lord, J. Amer., Chem. Soc., 88, 4752, 1966
17 E.J.Corey, W.E.Russey et P.R.Ortiz de Montellano, J. Amer. Chem. Soc., 88, 4750, 1966
18 E.E.van Tamelen et T.J.Curphy, Tetrahedron letters, 121, 1962
19 P.Benveniste et R.A.Massy-Westropp, Tetrahedron letters 37, 3553, 1967
20 W.W.Reid, Communication personnelle
21 Y.Nakatani, Travaux en cours
22 P.D.C. Dean, P.R. Ortiz de Montellano, K.Bloch et E.J.Corey, J. Biol. Chem., 242(12), 3014, 1967
23 J.H.Richards et J.B. Hendrickson, Biosynthesis of Steroïds, Terpenes and Acetogenins, W.A.Benjamin, New York, 1964
24 D.Arigoni, Steric aspects of the chemistry and biochemistry of natural products p. 32, Cambridge Ltd., 1960

25 D.H.R.Barton et G.P.Moss, Chem. Commun., 261, 1966
26 J.C.Knight, P.D.Klein et P.A.Szczepanik, J. Biol. Chem., 241(7),
27 E.Kodicek, Ciba Found. Symp. on the biosynthesis of terpenes and sterols, p. 173, Churchill, London,1959
28 H.Katsuki et K.Bloch, J.Biol. Chem.,242(2), 222, 1967
29 G.Ponsinet et G.Ourisson, Bull.Soc.Chim., 3682, 1965
30 M.Akhtar, M.A.Parvey et P.F.Hunt, Biochem. J., 100, 38c, 1966
31 P.Benveniste, Thèse Dr-Ingénieur, Strasbourg 1964
32 A.A.Battersby et C.V.Parry, Tetrahedron letters, 787, 1964
33 R.D.Bennett et E.Heftmann, Phytochem. 4, 475, 1965
34 H.H.Rees, E.I.Mercer et T.W.Goodwin, Biochem. J.,99, 726, 1966
35 J.W.Cornforth, R.H.Cornforth, C.Donninger, G.Popjàk, Y.Shimizu, S.Ichii, E.Forchielli et E.Caspi, J.Amer. Chem. Soc., 87, 3224, 1965
37 S.Bader et D.Arigoni, Proc.Chem.Soc., 16, 1964
38 V.R.Villanueva, E.Lederer et M.Barbier, Bull.Soc. Chim., 1423, 1964
39 L.J.Goad, S.A.Hammam, A.Dennis et T.W.Goodwin, Nature, 210, 1322, 1966
40 M.Akhtar, P.F.Hunt et M.A.Parvez, Chem.Commun., 16, 565, 1966
41 G.Ourisson, P.Crabbé et O.R.Rodig, Tetracyclic triterpenes, Hermann, Leeds, 1964
42 J.S.G.Cox, F.E.King et T.J.King, J.Chem.Soc., 514, 1959
43 M.Barbier et M.F.Hugel, Bull.Soc.Chim., 2012,1964
44 C.Djerassi, J.C.Knight et D.I.Wilkinson, J.Amer. Chem. Soc., 88, 790, 1966
45 R.J.Gautheret, La culture des tissus végétaux, Masson, Paris, 1959
46 P.Benveniste, L.Hirth et G.Ourisson, Phytochem. 5, 31, 1966
47 R.L.Rowland, P.H.Latimer et J.A.Giles, J. Amer. Chem. Soc., 78, 4680, 1956
48 P.Benveniste, L.Hirth et G.Ourisson, Phytochem.5, 45, 1966
49 P.Benveniste, Phytochem., sous presse
50 J.D.Ehrhardt, Thèse Dr-Ingénieur, Strasbourg 1967
51 F.Sondheimer et Y.Mazur, J. Amer. Chem. Soc., 80, 6293, 1958
52 K.Schreiber et G.Osske, Tetrahedron 20, 2575, 1964
53 L.J.Goad et T.W.Goodwin, Biochem. J. 99, 735, 1966
54 L.J.Goad et T.W.Goodwin, European J. Biochem. 1, 357, 1967
55 B.L.Williams, L.J.Goad et T.W.Goodwin, Phytochem., 6, 1137, 1967

56 J.Bergman, B.O.Lindgren et C.M.Svahn, Acta Chem. Scand., 19, 1661, 1965

57 W.W.Reid et M.J.Bernard, Biochem.J. 100, 13p, 1966

58 C.Djerassi, G.W.Krakower, A.J.Lemin, K.H.Liu, J.S.Mills, et R.Villotti, J. Amer. Chem. Soc., 80, 6284, 1958

59 F.Gautschi et K.Bloch, J.Biol. Chem., 233, 1343, 1958

60 J.L.Gaylor, J.Biol. Chem., 238, 1649, 1963

61 J.D.Ehrhardt, L.Hirth et G.Ourisson, Phytochem., 6, 815,1967

62 M.von Ardenne, G.Osske, K.schreiber, K.Steinfelder et R.Tümmler, Kulturpflanze, 13, 101,1965

63 R.Aexel, S.Evans, M.Kelly et H.J.Nicholas, Phytochem., 6, 511, 1967

64 E.Capstack, N.Rosin, G.A.Blondin et W.R.Nes, J.Biol. Chem., 240(8) 3258, 1965

65 E.Fedeli, A.Lanzani, P.Capella et G. Jacini, J.Amer.Oil Chemist's Soc., 254, 1966

66 G.Ponsinet et G.Ourisson, Phytochem., 4, 799, 1965

67 G.Berti, F.Bottari, A.Marsili, I.Morelli et M.Polvani, A.Mandelbaum Tetrahedron letters, 2, 125, 1967

68 G.Berti, F.Bottari, A.Marsili, B.Macchia, G.Ourisson et H. Piotrowska, Bull. Soc. Chim. France, 2359, 1964

69 D.H.R.Barton, J. Chem. Soc., 1444, 1951

70 B.L.Williams, L.J.Goad et E.I.Mercer, Biochem. J., 96, 31p, 1965

71 H.P.Kaufmann et A.Sen Gupta, Fette Seifen, 66, 461, 1964

72 L.J.Goad, Communication personnelle

73 G.Ponsinet et G.Ourisson, Phytochem., 6, 1235, 1967

74 H.R.Bentley, J.A.Henry, D.S.Irvine et F.S.Spring, J. Chem. Soc., 3673, 1953

75 G.Ponsinet et G.Ourisson, Phytochem., sous presse

76 C.Djerassi, J.C.Knight et H.Brockmann, Chem. Ber., 97, 3118, 1964

77 K.S.Brown et S.M.Kupchan, J. Amer. Chem. Soc., 84, 4590, 1962

78 C.Djerassi et R.Mc Crindle, J. Chem. Soc., 4034, 1962

79 S.Corsano, J.M.Mellor et G.Ourisson, Chem.Commun., 185, 1965

80 G.Biglino, J.M.Lehn et G.Ourisson, Tetrah.letters, 1681, 1963

81 R.D.Bennett, E.Heftmann, Arch. Biochem. Biophys., 112(3), 616, 1965

82 R.D.Bennett et E.Heftmann, Phytochem., 4, 574, 1965

83 R.D.Bennett et E.Heftmann, Phytochem., 4, 873, 1965

84 P.Benveniste, L.Hirth et G.Ourisson, C.R. Acad. Sci. Paris, 259, 2284, 1964

85 C.S.Barnes, M.N.Galbraith, E.Ritchie et W.C.Taylor, Austral. J. Chem., 18(9), 1411, 1965

86 G.Ourisson, F.Patil, Saltikova, Matyukhina et Ryabinin, Bull. Soc. Chim., sous presse

87 W.W.Reid et M.J.Bernard, Chem. and Industry, 997, 1967

88 S.Corsano, H.Linde, G.Piancatelli et L.Panizzi, Chimia, 21, 130, 1967

89 R.B.Clayton, A.N.Nelson et I.D.Frantz, J. Lipid Research, 4, 166, 1963

90 R.A.Massy-Westropp, Résultats non publiés

II PARTIE

BIOSYNTHESE DU SQUALENE DANS UN SYSTEME ACELLULAIRE EXTRAIT DE TISSUS DE TABAC CULTIVES IN VITRO

ABREVIATIONS

ATP	*Adénosine triphosphate*
ADP	*Adénosine diphosphate*
NAD	*Nicotinamide adénine dinucléotide*
NADH	*Nicotinamide adénine dinucléotide réduite*
NADP	*Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*
NADPH	*Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite*
AMV	*Acide mévalonique*
GSH	*Glutathion réduit*
PCMB	*Parachloromercuribenzoate*
DOC	*Déoxycholate de sodium*
EDTA	*Ethylène - diamine - tétraacétate*
Tris	*Tris (hydroxyméthyl) aminométhane*
S_{10}, S_{100} etc...	*Surnageant d'une centrifugation à 10 000, 100 000 g etc ...*

-=-=-=-=-

INTRODUCTION

Devant les difficultés que nous avons rencontré à faire pénétrer du cycloarténol et du lanostérol marqués dans les tissus anergiés de Tabac cultivés in vitro, nous avons entrepris de mettre au point un système acellulaire capable de synthétiser in vitro des stérols.

Les systèmes acellulaires présentent un grand intérêt en ce qui concerne les études biosynthétiques. Le système de NIRENBERG (1) constitue l'exemple le plus significatif. Rappelons que ce dernier est destiné à l'étude de la biosynthèse in vitro des protéines. Entre autres résultats, ce système a permis de préciser le rôle du RNA messager dans la transcription du message génétique du DNA. Il est évident que ces expériences qui nécessitaient l'utilisation de messagers de synthèse n'auraient jamais pu être effectuées in vivo.

En ce qui concerne le problème de la biosynthèse du cholestérol chez les animaux, l'utilisation de systèmes acellulaires s'est également avérée déterminante ; ces derniers ont en effet permis de démontrer la conversion in vitro d'un certain nombre de substances en cholestérol et ainsi de démontrer leur intervention dans le schéma biosynthétique conduisant au cholestérol.

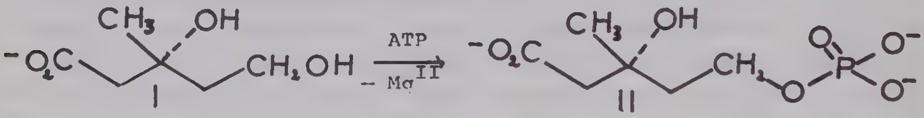
Rappelons brièvement l'ensemble des travaux effectués dans ce domaine.

En 1953, BUCHER (2) met au point un homogénat de foie de Rat capable de synthétiser in vitro du cholestérol à partir d'acide acétique 1 - ^{14}C. BLOCH et coll., utilisant ce système, ont alors démontré la conversion in vitro du squalène (3), du lanostérol (4) etc... en cholestérol et ainsi ont établi le schéma biosynthétique devenu classique par la suite. POPJAK et coll. ont ensuite déterminé les constituants actifs de ce sytème acellulaire (5, 6). Ils purent ainsi montrer que le site principal se trouve au niveau de la fraction microsomiale.

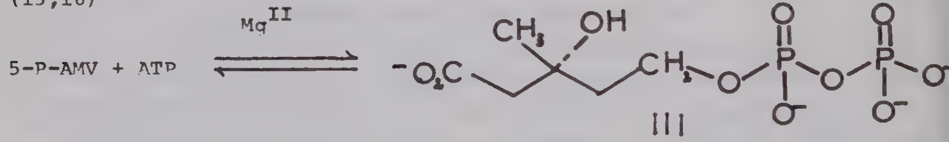
TABLEAU I

Enzymes de la biosynthèse du cholestérol

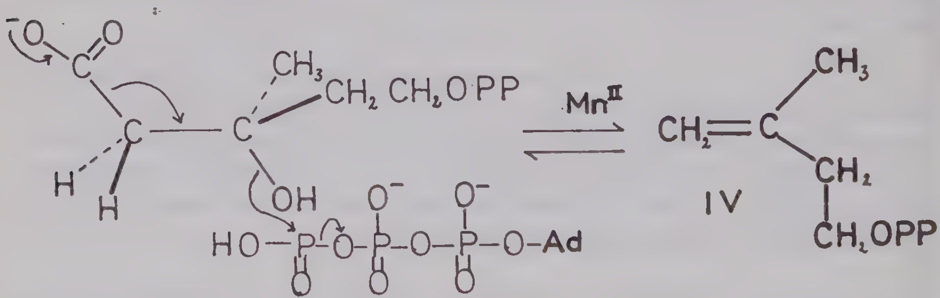
1. ATP:mévalonate-5-phosphotransférase = mévalonate kinase (13,14)



2. ATP:5-phosphomévalonate phosphotransférase = phosphomévalonate kinase (15,16)



3. ATP:5-pyrophosphomévalonate carboxy-lyase = pyrophosphomévalonate décarboxylase (17,18)



4. Isopentényl pyrophosphate isomérase (7,9,19)

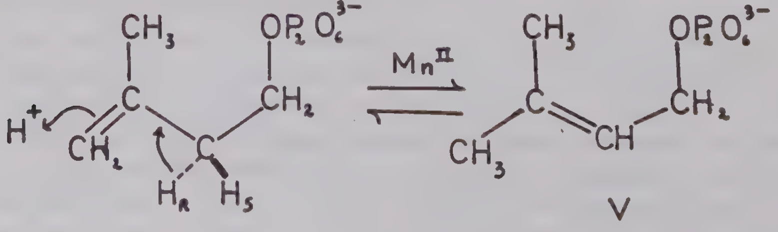
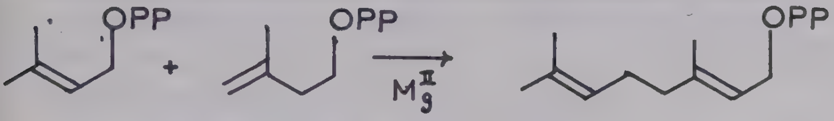


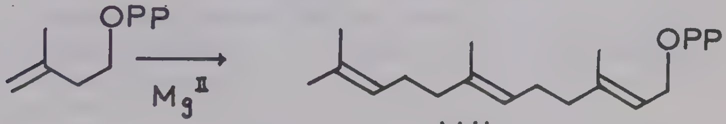
TABLEAU I (suite)

5. Diméthylallyl transférase et géranyl transférase (7,19,20)



VI

VI +



VII

6. Squalène synthétase (8,10)

2 pyrophosphate de farnésyle $\xrightarrow[Mg^{II}]{NADPH}$ SQUALENE

7. Squalène "époxydase" (non isolée)

SQUALENE $\xrightarrow[O_2]{NADPH}$ Epoxyde-2:3 de SQUALENE
IX

8. Epoxyde-2:3 de squalène cyclase(21)

Epoxyde-2:3 de squalène ⟶ "prolanostérol" ⟶ LANOSTEROL

9. LANOSTEROL - - - - - - - - - - - - → CHOLESTEROL

Aucune enzyme solubilisée

Cette fraction nécessite cependant, pour être active, une fraction soluble dont le rôle exact réside dans l'activation de l'acide mévalonique puis dans la formation de l'unité isoprénique active.

Par la suite, POPJAK et CORNFORTH (7, 8) PORTER et coll. (9, 10) et LYNEN (11, 12), poussant davantage le fractionnement, isolèrent une à une les enzymes responsables de ce métabolisme ; du moins jusqu'au pyrophosphate de farnésyle. L'ensemble de ces travaux est résumé dans le tableau 1.

Nous pouvons faire quelques constatations générales sur les cofacteurs requis pour ces transformations.

a) L'ATP intervient dans les étapes 1, 2 et 3, c'est-à-dire dans l'activation de la molécule d'acide mévalonique.

b) Le NADPH (ou NADH) intervient dans l'étape 6, la condensation de deux unités farnésyliques est en effet un processus réductif mettant en jeu le transfert stéréospécifique d'un ion hydrure provenant du NADH (8).

c) L'ion Mg^{II} intervient dans toutes les étapes, cependant certaines d'entre elles (étapes 3 et 4) semblent être plus spécifiquement catalysées par le manganèse (Mn^{II}).

d) Il apparait que l'ensemble de ces réactions font intervenir d'une façon plus ou moins importante les groupements sulfhydriles des enzymes (8, 10); dans la squalène - synthétase, il est en effet presque certain que l'un des sites actifs est un groupement sulfhydrile (10) ; ces enzymes sont donc très fortement inhibés par les réactifs spécifiques de ces groupements : iodoacétamide, N - éthylmaléimide et PCMB ; elles sont égalemnt très facilement dénaturées par oxydation de ces groupements. Elles ne fonctionnent correctement qu'en présence de substances protectrices des groupements sulfhydriles: mercaptoéthanol, glutathion, etc...

A ces remarques, nous devons ajouter deux points particulièrement importants :

a) Les étapes produisant de l'acide mévalonique au squalène sont <u>anaérobies</u>. Par contre, l'oxydation du squalène en époxyde - 2 : 3 de squalène est une réaction <u>aérobie</u> ; le cofacteur re-

quis pour effectuer cette réaction est le NADPH (ou NADH), cette transformation fait intervenir une oxydase à fonctions mutiples (22) :

$$\text{Squalène} + 2\ \text{NADH} + O_2 \longrightarrow \text{Epoxyde de squalène} + 2\text{NAD} + H_2O$$

De même, les réactions assurant la transformation du lanostérol en cholestérol sont également oxydatives et font probablement intervenir des enzymes analogues.

b) A partir du pyrophosphate de farnésyle et jusqu'au cholestérol, les enzymes sont particulaires; ces dernières n'ont pu, squalène - synthétase et époxyde - 2 : 3 de squalène - cyclase exceptées, être solubilisées (10, 21) *

A notre connaissance, aucun système acellulaire de plantes capable de synthétiser des stérols <u>in vitro</u> n' a été décrit. Ceci ne veut évidemment pas dire que personne ne se soit intéressé à ce problème ; les nombreux résultats très partiels acquis dans ce domaine prouvent en effet le contraire, cependant, il semble que le problème de l'isolement d'enzymes actives à partir de tissus de plantes ait posé de gros problèmes.

En l'absence de travaux concernant la biosynthèse des stérols, nous allons rapidement passer en revue les travaux les plus significatifs concernant la biosynthèse d'isoprénoïdes par des systèmes acellulaires de plantes.

BONNER et coll. (24) effectuent un homogénat de graines de pois en germination et étudient l'activité vis-à-vis de la synthèse d'isoprénoïdes d'un surnageant obtenu après une centrifugation à 10 000 g (S 10). Ce surnageant est utilisé dans des incubations en

* Encore faut-il dire que l'isolement de la squalène-synthétase vient d'être mis très sérieusement en doute (8)

présence d'acide mévalonique 2 - ^{14}C. Les auteurs isolent les substances suivantes : acide phospho - 5 mévalonique et pyrophospho - 5 mévalonique (II, III), les pyrophosphates d'isopentényle, de diméthylallyle, de géranyle et de farnésyle (IV, V, VI, VII). Ces travaux montrent que la série de métabolites dérivée de l'acide mévalonique est, comme on pouvait s'y attendre, identique à celle trouvée dans le foie et la levure.

GOODWIN et coll. (25, 26) étudient la localisation intracellulaire des enzymes activatrices de l'acide mévalonique, c'est-à-dire les enzymes 1 et 2 du tableau I. Ces enzymes sont localisées dans les chloroplastes, mais également dans le cytoplasme. Il est également démontré que la membrane chloroplastidique est imperméable à l'acide mévalonique ; ces résultats semblent indiquer l'existence, dans les tissus chlorophylliens, de deux sites de formation des terpénoïdes :

- l'un réside dans les chloroplastes ; dans ces derniers, l'acide mévalonique est utilisé pour la synthèse des caroténoïdes, de la plastoquinone et de la chaine phytyle de lachlorophylle.

- l'autre est cytoplasmique ; l'acide mévalonique y est utilisé principalement pour la synthèse des stérols.

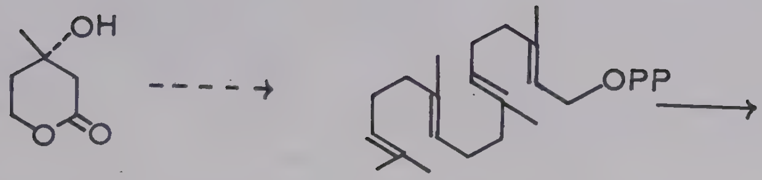
Parmi des travaux analogues, citons ceux de LOOMIS(14) isolant et purifiant partiellement une ATP : mévalonate - 5 - phosphotransférase de <u>Cucurbita pepo</u>, ainsi que ceux de VALENZUELA et coll. qui synthétisent des pyrophosphates de prénols à partir d'acide mévalonique au moyen d'un système cellulaire d'aiguilles de Pin.(29)

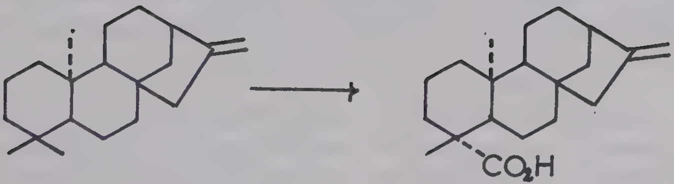
De l'ensemble de ces travaux, nous pouvons tirer certaines conclusions :

a) Les systèmes acellulaires utilisés se sont montrés relativement actifs pour la synthèse de pyrophosphates de phénols (Tableau I) étapes1 à 5, cependant beaucoup moins actifs en ce qui concerne l'étape 6, qui correspond, rappelons-le, à la dimérisation du pyrosphate de farnésyle, réaction conduisant au squalène et nécessitant, chez les animaux, la participation de fractions particulaires.

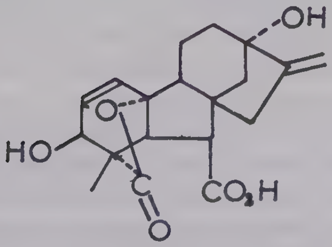
b) Aucune substance postérieure au squalène dans la biosynthèse des stérols ne semble avoir été signalée.

TABLEAU II





(-)-kaurène　　　　acide (-)-kaurénique



acide gibérellique

XI

Nous devons mettre à part les travaux suivants :

NES et coll. (30) réalisent la transformation *in vitro* de l'acide mévalonique en β - amyrine avec un surnageant post-mitochondrial (S 10) de graines de pois en germination. Quoique la β - amyrine, triterpène pentacyclique, relève comme nous l'avons vu dans la première partie de ce travail, d'un métabolisme distinct de celui des stérols, il est intéressant de noter la synthèse *in vitro* de cette substance qui implique que, dans le matériel de ces auteurs, l'oxydation du squalène en époxyde 2 : 3 de squalène et la cyclisation de ce dernier sont possibles.

WEST et coll. (31, 32, 33), dans le cadre d'une étude de la biosynthèse *in vitro* des gibérellines (XI) réalisent la série de transformations indiquées sur le tableau II avec un homogénat d'embryon d'*Echinocystis macrocarpa*. Ces travaux ne concernent évidemment pas la biosynthèse de stérols, ils montrent cependant que dans le cadre de la biosynthèse *in vitro* de diterpènes, il est cependant possible de franchir un nombre relativement important d'étapes.

Enfin PONSINET, utilisant des latex d'Euphorbes, obtient des triterpènes tétracycliques à partir d'acétate 1 - ^{14}C (34). Suivant la provenance du latex, les couples suivants sont obtenus :

Euphorbia lathyris	cycloarténol, méthylène-24 cycloartanol lanostérol
Euphorbia resinifera	euphol, euphorbol

Il s'agit d'un système complet n'ayant subi aucune transformation et on pouvait s'attendre à un matériel idéal pour l'étude de la biosynthèse des stérols. Malheureusement, il se trouve que les latex d'Euphorbes ne contiennent que des traces de stérols et que les triterpènes semblent marquer dans ce matériel l'aboutissement de ce métabolisme.

Comme nous avons pu le constater, aucun système acellulaire de plantes capable de synthétiser *in vitro* des stérols n'a été décrit. Il semble que les principaux auteurs se soient heurtés à de grosses difficultés pour la préparation d'enzymes actives de plantes. Ces difficultés ont été discutées en détail par LOOMIS (35). Pour cet auteur, une des principales raisons de la faible activité des systèmes acellulaires de plantes réside dans les quantités souvent importantes de phénols présents.Ces derniers agiraient sur les protéines en se combinant irréversiblement à ces dernières et les dénatureraient.

Etant donné que l'ensemble de nos études *in vivo* avait été effectué avec des tissus de Tabac anergiés cultivés *in vitro*, nous avons repris ce matériel pour les études *in vitro*. Nous disposions ainsi d'un matériel dans lequel un très grand nombre d'intermédiaires possibles de la biosynthèse des stérols était connu ; cela simplifiait a priori tous les problèmes analytiques (36, 37, 38). Par ailleurs, nous disposions d'un matériel stérile, ce qui nous mettait à l'abri d'artefacts dus à des contaminations bactériennes.

Pour réaliser ce travail, nous nous sommes inspirés des techniques qui ont permis de mettre au point des systèmes acellulaires actifs à partir de tissus de foie de rat. Toutes nos incubations de systèmes acellulaires de plantes comprenait un témoin, réalisé dans des conditions identiques avec un système acellulaire de foie de rat. Ce témoin s'est avéré très important car il nous a, d'une part,permis de contrôler nos conditions expérimentales et d'autre part de mieux comprendre les problèmes communs posés par la biosynthèse des stérols dans ces deux systèmes. Parmi ces problèmes, nous nous sommes intéressés à résoudre celui du site de formation de ces substances; Si, dans le foie de rat, on a montré que la fraction microsomiale est probablement le site de la biosynthèse du cholestérol, du moins à partir du squalène (39) rien ou presque n'est connu dans ce domaine chez les plantes. Nous avons donc pensé qu'il fallait contribuer à combler cette lacune, ce qui nous a conduit, dans un premier temps, à mettre au point des techniques de préparation de fractions subcellulaires. Dans un deuxième temps, nous nous proposions de comparer l'activité de ces fractions.

-=-=-=-=-

I - Préparation de fractions subcellulaires

Le processus correspondant à l'isolement de fractions subcellulaires est schématisé sur le Tableau III. Les tissus (indiféremment cultures de tissus de Tabac ou foie de rat) sont homogénéisés dans un appareil du type Elvehjem - Pother ; on prend soin qu'il existe un jeu important (0,3 mm) entre le piston de téflon et le tube de verre. Le tampon utilisé a la composition suivante : tris HCl pH 7,4 (0,05 M), saccharose (0,25 M), $MgCl_2$ (0,004 M), KCl (0,01 M) EDTA (0,001 M), GSH (0,005 M), nicotinamide (0,01 M). Ce milieu correspond, dextrane et ficoll en moins, à celui préconisé par WILDMANN (40) pour l'isolement d'organites de Tabac ; nous avons ajouté de la nicotinamide dans le but d'inhiber la destruction du NADH par les enzymes microsomiales. L'homogénat est filtré sur gaze, le filtrat est centrifugé à 1 000 g pendant cinq minutes pour éliminer les noyaux, le surnageant obtenu est centrifugé à 30 000 g pendant vingt minutes et dans ces conditions, on sédimente les mitochondries et également d'autres organites (plastes, proplastes ?) que nous n'avons pas caractérisés ; enfin, le surnageant postmitochondrial est centrifugé à 100 000 g pendant 90 minutes en présence ou non de DOC (1 mg/ml de surnageant). Le culot contient la fraction microsomiale ou ribosomale, le surnageant les enzymes solubles. Les fractions particulaires ainsi obtenues sont remises en suspension dans un tampon contenant : tris HCl pH 7,4 (0,01 M) ; $MgCl_2$ (0,002 M) ; mercaptoéthanol (0,0025 M) et que nous appellerons tampon(tris, Mg, SH). La concentration en azote protéique est ajustée entre 2 et 4 mg/ml. Les déterminations de l'azote protéique sont effectuées suivant la méthode de LOWRY(41).

1 - Nature de la fraction microsomiale obtenue

Le comportement de la fraction microsomiale en ultracentrifugation analytique est indiqué sur la figure 1. On voit que le profil obtenu, dans le cas où la fraction microsomiale a été traitée au DOC, est identique au profil obtenu avec des microsomes non traités au DOC. Le pic 80 S * correspond aux ribosomes cytoplasmi-

*Les coefficients de sédimentation sont approchés ; on n'a pas effectuer l'évaluation à concentration nulle.

TABLEAU III

Préparation de fractions subcellulaires *

Homogénéisation

Filtration sur gaze

Centrifugation 1 000 g 5 min

culot (noyaux)

surnageant S_1

Centrifugation 30 000 g 20 min

culot (mitochondries, plastes...) suspendus dans tampon (tris, Mg, SH)

surnageant S_{30}

Centrifugation 100 000 g 90 min. en présence ou non de DOC (mg/ml)

culot (microsomes ou ribosomes) suspendus dans tampon (tris, Mg, SH)

surnageant S_{100}

* Toutes ces opérations sont effectuées entre 0 et 4°

Fig 1a

Microsomes préparés en présence de DOC

Fig 1B

Microsomes préparés sans DOC

Ultracentrifugation de microsomes de tissus de Tabac cultivés in vitro
Vitesse du rotor : 39.460 rpm
Photos prises 4min après avoir atteint la vitesse maximale

ques identifiés par WILDMANN (42) ainsi que SISSAKIAN (43) dans des extraits acellulaires provenant respectivement de feuilles de Tabac et de pois ; le pic 106 S* correspond à des dimères de ces derniers. Quant aux pics plus lourds, ils pourraient correspondre à des polysomes. Par ailleurs, il faut noter que, dans le cas où les microsomes n'ont pas été traités au DOC, on obtient au début de l'ultracentrifugation analytique, un abondant sédiment. On en déduit donc que la fraction microsomiale des extraits de tissus de Tabac cultivés in vitro contient, à côté d'une fraction membranaire qui peut être solubilisée par le DOC, une proportion importante de ribosomes libres. Cette observation confirme celle effectuée par NOVELLI (44) sur des cultures de tissus de maïs.

Nous devons faire deux observations :

a) Les rendements en microsomes obtenus sont très faibles. A partir d'environ 50 grammes de tissus frais, nous obtenons une quantité de microsomes correspondant à environ 10 mg d'azote protéique.

b) Le profil obtenu pendant l'ultracentrifugation analytique de nos préparations microsomiales ne comporte pas de pics légers ; il semble qu'il n'y ait ni dégradation, ni dissociation en sous-unités 60 S et 35 S de nos ribosomes et ceci en dépit de la faible concentration en Mg^{II} de nos préparations ($2 . 10^{-3}$ M).

2 - Nature des autres fractions particulaires

Les culots des centrifugations à 1 000 g et à 30 000 g contiennent, en plus des noyaux et des mitochondries, des organites de nature plastidiale. Rappelons en effet que si les tissus anergiés de Tabac cultivés in vitro ne contiennent pas de chloroplastes, ils pourraient contenir des précurseurs de ces derniers (proplastes) ainsi que des plastes ; nous nous proposons de contribuer à l'élucidation de ce dernier point.

* cf. Remarque de la page précédente.

II - *Incubations*

1 - Essais avec les surnageants S_{30}

Avant de tester les fractions subcellulaires, nous avons fait des essais avec des surnageants postmitochondriaux S_{30}: ceux - ci sont capables, dans le cas du foie de rat, de réaliser la biosynthèse du cholestérol in vitro (6).

Dans le cas des cultures de tissus de Tabac, on peut s'attendre à ce que ces surnageants contiennent des fragments de réticulum endoplasmique , des ribosomes libres, des enzymes, ainsi que tous les constituants solubles de la cellule (substances phénoliques, cofacteurs endogènes, glucides, etc...) ; il s'agit dons d'un système complet analogue à celui de NIRENBERG (1).

Le mode opératoire est le suivant : à 5 ml de surnageant S_{30} on ajoute 15 µM d'ATP, 5 µM de NADH et 1 µC, soit 0,2 mg d'acide mévalonique 2 - ^{14}C. On incube pendant deux heures à 30°. L'incubation est arrêtée avec de la potasse, on ajoute 5 ml d'éthanol ainsi que 0,2 mg de squalène entraineur et on saponifie sous azote pendant une heure. La mtière insaponifiable est extraite à l'éther de pétrole et la phase organique est traitée de la manière habituelle. L'éther de pétrole est évaporé et le résidu obtenu est chromatographié en couche mince ; la lecture de la répartition de la radioactivité est effectuée avec un lecteur de chromatogrammes BERTHOLD ; on obtient le diagramme de la figure 2.

Sur ce diagramme figurent 3 pics. Le pic A est le plus important ; il correspond à un groupe de substances : les prénols ; parmi ces derniers, nous avons identifié de façon certaine le farnésol (XII).

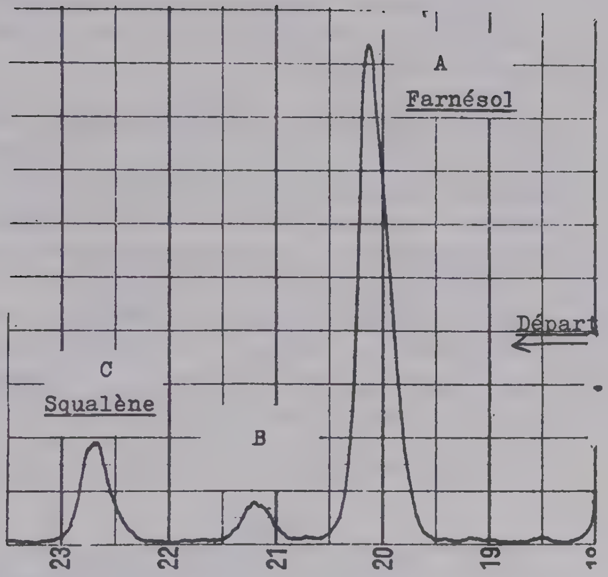


Fig 2 Chromatographie en couche mince de l'insaponifiable provenant de l'incubation d'un surnageant S_{30} en présence d'acide mévalonique 2-^{14}C.
En abscisse et de droite à gauche la direction de migration du solvant.
En ordonnée, l'intensité de la radioactivité

Il faut noter que ce farnésol a été obtenu dans un insaponifiable en l'absence de tout traitement acide ; il s'agit donc de farnésol présent à l'état libre à la fin de l'incubation ; nous avons vu que la forme biologiquement active est l'ester pyrophosphorique ; ceci implique que notre préparation S_{30} contient une phosphatase qui hydrolyse le pyrophosphate de farnésyle ; le farnésol libéré étant biologiquement inactif, il s'accumule.

Notons par ailleurs que le comportement chromatographique de farnésol est voisin, sinon identique, à celui des phytostérols présents dans nos préparations. Cette ambiguité a été levée en faisant agir l'acide p - nitroperbenzoïque sur le mélange des acétates de phytostéryles et de farnésyle ; dans ces conditions, cette dernière substance donne un mélange complexe de substances polaires alors que les acétates de stérols donnent des acétates - époxydes bien définis. Nous avons ainsi pu vérifier que toute la radioactivité accompagnait les dérivés de l'acétate du farnésyle, alors que les acétates - époxydes de stérols étaient rigoureusement inactifs.

La substance correspondant au pic B n'a pas été identifiée.

Enfin le pic C correspond à un hydrocarbure; ce dernier a été identifié au squalène (VIII) par chromatographie dans des systèmes de solvants convenables en présence de squalène entraineur (37) et par la préparation d'un dérivé, l'hexachlorure, et recristallisation de ce dernier à activité spécifique constante (45).

Dans toutes les expériences qui vont suivre, le squalène formé biosynthétiquement sera élué des chromatogrammes et sa radioactivité déterminée grâce à un compteur à scintillation liquide de PACKARD.

Le tableau IV indique la répartition de la radioactivité entre le farnésol et le squalène.

Le tableau V indique l'influence du pH du tampon d'homogénéisation sur la quantité de squalène synthétisé.

TABLEAU IV

Les milieux d'incubation contiennent S_{30} (5 ml), ATP (15 µM), NADH(5 µM)
AMV 1 µC ≈ 0,2 mg ≈ 1,1 . 10^6 d.p.m.

Activité *	Insaponifiable	Farnésol	Squalène
Système complet	97 000	49 000	7 000
- ATP, - NADH	0	0	0
- NADH	110 000	52 000	0
- GSH	0	0	0

* exprimée en d.p.m.

TABLEAU V

Mêmes conditions que dans le tableau IV.

pH	7	7,4	7,8	8,2
Squalène *	4 800	9 100	3 000	4 200

* exprimé en d.p.m.

TABLEAU VI

	Microsomes	S_{100}
Squalène *	10 800	1 400

* exprimé en d.p.m.

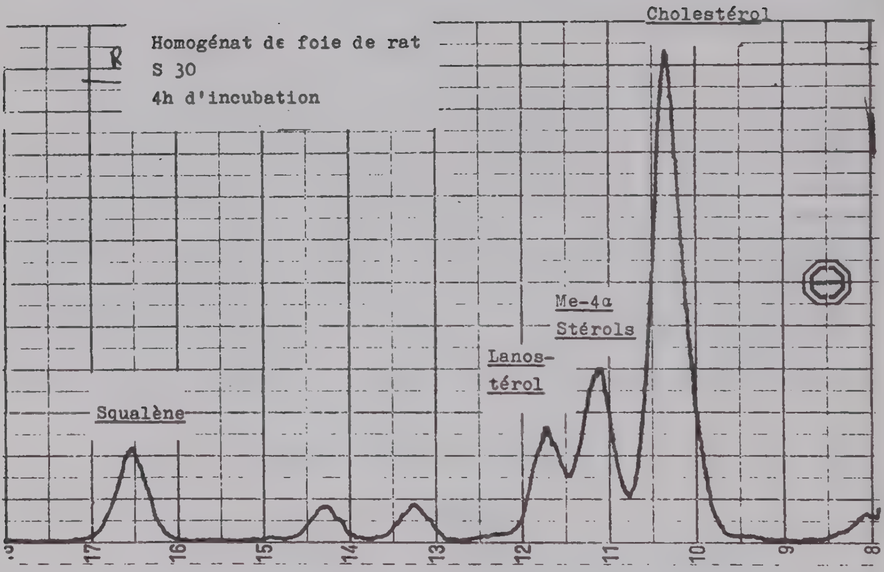


Fig 3 Chromatographie de l'insaponifiable provenant de l'incubation d'un surnageant S_{30} de foie de rat.
En abscisse et de droite à gauche la direction de migration du solvant
En ordonnée l'intensité de la radioactivité.

Au cours d'une autre expérience, l'incubat n'a pas été saponifié, mais centrifugé à 100 000 g pendant 90 minutes. On a obtenu d'une part un culot microsomial et d'autre part un surnageant S_{100} ; ces deux fractions ont été traitées séparément. Le tableau VI indique la répartition de la radioactivité contenue dans le squalène, dans le surnageant S_{100} et dans le culot microsomial.

Nous voyons donc qu'un surnageant postmitochondrial S_{30} métabolise activement l'acide mévalonique. Les produits synthétisés sont le farnésol et le squalène. Il faut noter que :

a) Nous observons une accumulation de farnésol.

b) La quantité de squalène synthétisée est médiocre.

c) Aucune substance postérieure au squalène n'est décelée ; en particulier, le cycloarténol est absent.

d) Comme on pouvait s'y attendre, l'ATP et le NADH sont des cofacteurs essentiels. Le glutathion est également indispensable au fonctionnement du système.

e) Le pH optimal semble se situer aux alentours de 7,4.

f) La synthèse du squalène a lieu au niveau de la fraction microsomiale.

Ces résultats nous permettent de conclure que le surnageant restant contient les enzymes 1, 2, 3, 4, 5 et 6 du tableau I. Quant aux enzymes assurant la synthèse des substances postérieures au squalène dans le métabolisme des stérols, on peut dire qu'elles sont absentes ou totalement inactives.

On pouvait penser à une erreur expérimentale conduisant à la destruction des enzymes responsables de l'oxydation du squalène ; nous avons alors préparé un surnageant postmitochondrial S_{30} à partir de foie de rat en utilisant des techniques identiques. Après incubation, extraction de la matière insaponifiable et chromatographie de cette dernière, nous avons obtenu le diagramme de la figure 3. On voit en plus du pic du squalène, plusieurs autres pics; les substances correspondantes ont été éluées et identifiées respectivement au lanos-

térol et au cholestérol.

Nos techniques d'homogénéisation et d'incubation conviennent donc à la synthèse in vitro de stérols par un système enzymatique de foie de rat.

Rappelons que le surnageant S_{30} est une suspension très diluée de fragments de système réticulo-endothélial. Nous avons alors pensé que la grande dilution en membranes ergastoplasmiques de notre système était le facteur limitant la production du squalène, donc de celle des susbtances postérieures à ce dernier dans la chaine métabolique conduisant aux stérols. On pouvait penser concentrer ce système en préparant des fractions subcellulaires et en les resuspendant dans un volume aussi faible que possible de tampon(tris,Mg, SH).

2 - Incubation de fractions particulaires

La quantité de squalène formée au cours des incubations nous a permis d'évaluer l'activité des différentes fractions subcellulaires expérimentées. Nous avons considéré ici : la fraction microsomiale décrite plus haut, une fraction correspondant au culot de la centrifugation à 30 000 g et comprenant donc en majorité des mitochondries, enfin une fraction correspondant au culot à 1000 g et composée de noyaux et également d'organites non caractérisés (proplastes).

Les conditions d'incubation figurent sur le tableau VII : aux organites suspendus dans du tampon, on ajoute 1,5 ml du surnageant S_{100} ; ce surnageant contient en effet les enzymes responsables de la transformation de l'acide mévalonique en pyrophosphate de farnésyle.

On voit que :

a) Les microsomes, lorsqu 'ils sont associés au surnageant S_{100}, sont beaucoup plus actifs que les autres organites.

b) Le surnageant S_{100} seul est dépourvu d'activité squalène-synthétasique.

c) Les microsomes, en l'absence d'enzymes S_{100}, sont également

Tableau VII

Les milieux d'incubation comportent: fractions subcellulaires (2 à 4mg d'azote protéique), S_{100} (1,5ml), ATP (7,5µMoles), NADH (2,5 µ Moles), tris HCl pH 7,4 (10 µMoles), GSH (5 µMoles), $MgCl_2$ (2 µ Moles), AMV (d,l) 2-^{14}C (0,16 µMoles ≈ $8{,}8.10^5$ dpm)

	Activité du squalène (1)
Microsomes seuls	0
Surnageant S_{100} seul	0
Microsomes + S_{100}	6.000
Culot 30.000g + S_{100}	440
Culot 1.000g + S_{100}	460

(1) En désintégrations par minute (dpm) et pa mg de protéines particulaires, déduction faite du mouvement propre du compteur.

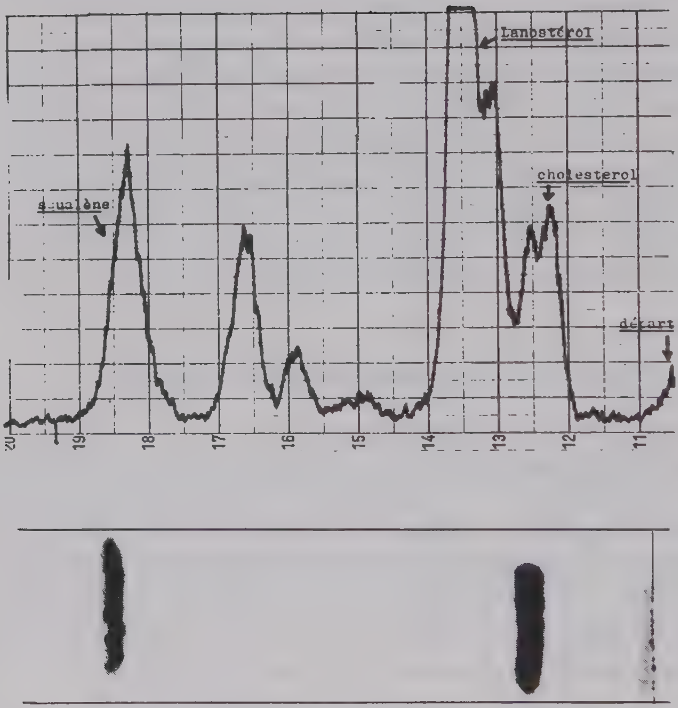


Fig 4 Chromatographie de l'insaponifiable provenant de l'incubation de microsomes de foie de rat en présence de surnageant S_{100} et d'acide mévalonique 2-^{14}C.
Le cholestérol et le squalène présents dans les incubats apparaissent très nettement après révélation des chromatogrammes par l'acide sulfurique.

inactifs.

d) Les activités obtenues sont généralement faibles et la reproductivité des résultats médiocre : certaines incubations nous ont en effet donné des synthèsesde squalène doubles ou triples de celles indiquées sur le tableau VII alors que d'autres ont donné des résultats pratiquement nuls.

Des incubations identiques ont été effectuées avec des microsomes et des surnageants S_{100} provenant d'un homogénat de foie de rat. Nous avons obtenu le diagramme de la figure 4. Sur ce diagramme, on voit, en plus du pic correspondant au squalène, un autre pic très important ; la substance correspondant à ce pic a été éluée et identifiée au lanostérol. On aperçoit également des pics correspondant à des substances plus polaires ; parmi ces dernières, nous avons identifié le cholestérol.

Ainsi, nos techniques de préparation de fractions subcellulaires ne semblent pas être la cause du mauvais fonctionnement du système obtenu à partir de cultures de tissus de Tabac. Nous pensons plutôt que le surnageant S_{100} de Tabac contient des substances fortement inhibitrices.

Nous avons également rapporté dans l'introduction les échecs rencontrés avec des systèmes acellulaires de plantes (35), échecs dus à la dénaturation des enzymes et également des fractions particulaires par des substances phénoliques.

Nous avons alors pensé qu'il fallait précipiter au sulfate d'ammonium les enzymes contenus dans le surnageant S_{100} ; après dissolution, puis dialyse de ces dernières, on pouvaits'attendre à :

a) concentrer l'activité du surnageant S_{100}

b) se débarasser des substances à faible poids moléculaire (ions métalliques, cofacteurs endogènes, phénols etc...)

c) débarasser au moins partiellement nos enzymes des substances inhibitrices.

d) contrôler notre système : du fait des dialyses, les cofacteurs endogènes sont éliminés et il faut les rajouter au moment des incubations, ce qui permettait de mieux étudier leur action.

3 - Incubations avec des enzymes précipités au sulfate d'ammonium

a) Préparation des enzymes

Le sulfate d'ammonium est ajouté au surnageant S_{100} jusqu'à 90 % de saturation, le précipité formé est centrifugé, le surnageant éliminé et le culot dissout dans une quantité déterminée de tampon (tris, Mg, SH). On dialyse 4 heures contre le même tampon en renouvelant ce dernier plusieurs fois. La concentration en azote protéique est ajustée à environ 5 mg/ml. La préparation obtenue sera appelée E_O^{90}.

b) Incubations

La compositon du milieu incubation est indiquée sur le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Les milieux d'incubation comportent : microsomes (1,5 mg d'azote protéique), enzymes E_o^{90} (7,5 mg azote protéique) ou S_{100}(1,5 ml) ATP (7,5 µM), NADH (2 µM), tris, HCl pH 7,4 (20 µM), mercaptoéthanol (5 µM), $MgCl_2$ (4 µM), AMV (dl) 2-^{14}C (0,16 µM ≃ 8,8 . 10^5 d.p.m.)

	Microsomes + S_{100}	Microsomes + Enzymes E_o^{90}
Activité de l'insaponifiable *	52 000	200 000
Activité du squalène *	1 500	17 400

* en d.p.m. et pour 1 mg de microsomes

On voit que les microsomes sont près de dix fois plus actifs lorsqu'ils sont incubés en présence d'enzymes E_o^{90} que lorsqu'ils sont incubés avec le surnageant brut S_{100}. Cependant, l'inhibition au niveau du squalène subsiste. En particulier, l'époxyde - 2 : 3 de squalène n'est toujours pas décelé.

Ainsi, le fait d'utiliser des enzymes précipités au sulfate d'ammonium nous a permis d'augmenter nettement l'activité de la squalène - synthétase, mais ne nous a pas permis de lever l'inhibition de la synthèse des substances placées au-delà du squalène dans la chaine biosynthétique conduisant aux stérols.

Comme notre système est composé de deux phases : une phase soluble, contenant les enzymes activatrices de l'acide mévalonique, et une phase particulaire indispensable à la synthèse du squalène et des substances postérieures à ce dernier, on pouvait se demander si la spécificité de la biosynthèse que nous étudions ne résidait que dans la phase microsomiale. On pouvait alors penser remplacer la phase soluble par tout autre système capable de synthétiser <u>in vitro</u> du pyrophosphate de farnésyle. Il pouvait être alors tentant d'utiliser un système soluble extrait de foie de rat : en effet, un tel système serait a priori encore plus actif que le système E_o^{90} de plantes et ne contiendrait peut-être pas des substances inhibitrices. Par contre, on pouvait craindre qu'une incompatibilité se manifestât entre deux fractions aussi éloignées que des microsomes de plantes et des surnageants S_{100} de foie de rat.

Nous avons, dans nos expériences préliminaires, incubé des microsomes de tissus de tabac cultivés <u>in vitro</u> avec un surnageant S_{100} de foie de rat. Ce type d'expériences a été rapidement abandonné pour deux raisons :

α - En dépit de très grandes précautions apportées à l'ultracentrifugation des microsomes de foie de rat, les surnageants S_{100} se sont avérés capables de synthétiser activement du squalène ; ce résultat nous a beaucoup étonné, car les données de la littérature indiquent que la squalène - synthétase est une enzyme particulaire, difficile à solubiliser, et absente des surnageants S_{100} (6). Il apparait donc que nos techniques nous permettent de localiser la solubilisation, du moins partielle, de cet enzyme. Nous avons l'intention d'étudier en détail ce point très intéressant. Cependant, ce résultat constitue pour le mo-

ment un obstacle majeur à la réalisation de nos expériences d'incubations croisées.

β - De plus, une incompatibilité totale s'est manifestée entre le surnageant S_{100} de foie de rat et les microsomes de tissus de Tabac cultivés <u>in vitro</u> : en effet, quelques minutes après le mélange de ces deux fractions, on observe une abondante précipitation.

On pouvait alors penser qu'en préparant des enzymes à partir du surnageant S_{100} de foie de rat, on éliminerait les substances responsables de la précipitation des microsomes (hémoglobine glycogène, lipides etc...) et la squalène - synthétase.

4 - Expériences d'incubations croisées

a) Préparation des enzymes de foie de rat(6)

On ajoute du sulfate d'ammonium au surnageant S_{100} jusqu'à 80 % de saturation; on obtient un abondant précipité rose, ce dernier est centrifugé et le surnageant obtenu est éliminé ; le culot est dissout dans une quantité connue de tampon (tris, Mg, SH) et on dialyse contre le même tampon pendant 4 heures ; la dialyse une fois terminée, on ajoute du sulfate d'ammonium jusqu'à 30 % de saturation ; un abondant précipité se forme, on centrifuge ; le culot est éliminé et le surnageant est gardé ; on ajoute à ce dernier du sulfate d'ammonium jusqu'à 60 % de saturation : il se forme un précipité blanc ; on centrifuge ; le surnageant obtenu est éliminé et le culot blanc est dissout dans du tampon (tris, Mg, SH) pH 7,4 ; après dialyse, on ajuste la concentration en azote protéique à environ 10 mg/ml. La préparation obtenue est appelée E_{30}^{60} .

b) Incubations

On a réalisé les incubations suivantes :

- Enzymes E_{30}^{60} de foie de rat seules (témoin)
- Enzymes E_{30}^{60} de foie de rat + microsomes "tabac"
- Enzymes E_{0}^{90} de "tabac" seules (témoin)
- Enzymes E_{0}^{90} de "tabac" + microsomes de rat

Fig 5a

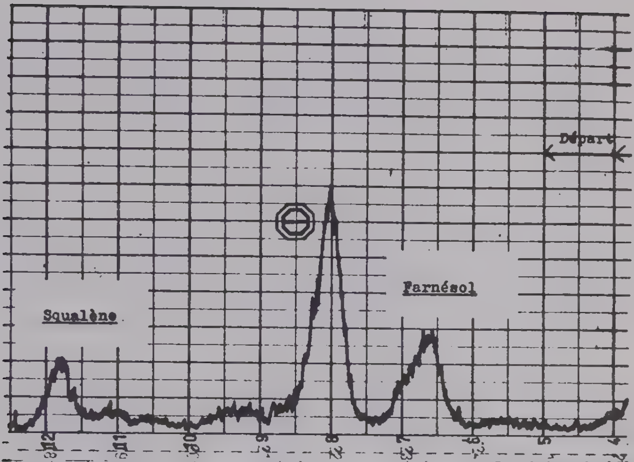


Fig 5b

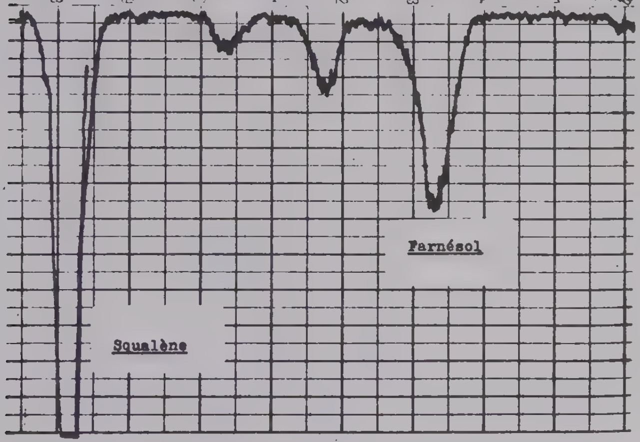


Fig 5a Chromatographie de l'insaponifiable provenant de l'incubation d'enzymes E_{30}^{60} de foie de rat.

Fig 5b Chromatographie correspondant à l'incubation d'enzymes E_{30}^{60} de foie de rat en présence de microsomes de tissus de Tabac cultivés _in vitro_

Fig 6b

Fig 6a

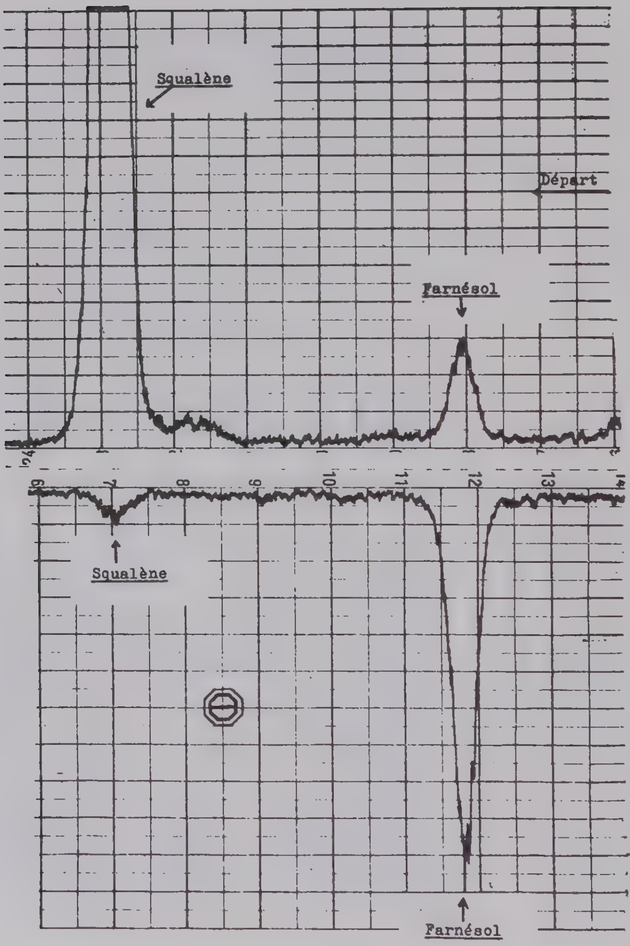


Fig 6a Chromatographie de l'insaponifiable provenant de l'incubation d'enzymes E_0^{90} de tissus de Tabac cultivés <u>in vitro</u>

Fig 6b Chromatographie correspondant à l'incubation d'enzymes E_0^{90} de tissus de Tabac cultivés <u>in vitro</u> en présence de microsomes de rat.

Les conditions d'incubation figurent sur le tableau IX.

Les diagrammes reproduits sur les figures 5 et 6 indiquent la répartition de la radioactivité sur les chromatogrammes.

TABLEAU IX

Aux fractions particulaires, on ajoute un mélange contenant : les enzymes solubles, tampon tris HCl pH 7,4 (15 µM), $MgCl_2$ (3 µM), KCl (15 µM), mercaptoéthanol (3,75 µM), ATP (7,5 µM), NADH (2,5 µM), AMV 2 - ^{14}C (0,16 µM ≃ 0,88 . 10^6 d.p.m.). On incube 1 heure à 36°.

	Microsomes (1)	Enzymes (1)	Squalène
E_{30}^{60} de rat seules	-	12,5	13 400 (2)
E_{30}^{60} de rat + microsomes de TTC (4)	0,88	12,5	80 000 (3)
E_{0}^{90} de TTC (4)	-	5,0	1 700 (2)
E_{0}^{90} de TTC + microsomes de rat	1,8	5,0	55 000 (3)
E_{0}^{90} de TTC + microsomes de TTC	1,5	7,5	17 400 (3)

(1) Azote protéique (mg)

(2) en d.p.m.

(3) en d.p.m. et par mg de protéines microsomiales

(4) Tissus de Tabac cultivés in vitro

On voit que :

α - Après le traitement décrit dans le paragraphe (a), les enzymes E_{30}^{60} ne contiennent plus qu'une faible activité squalène-synthétasique (figure 5 a).

β - L'addition aux enzymes E_{30}^{60} de foie de rat, de microsomes extraits de tissus de Tabac cultivés in vitro, provoque une stimulation très intense de la synthèse du squalène (figure 5 b). L'activité de ce système est également beaucoup plus élevée que l'activité du système obtenu en combinant les microsomes de"Tabac" avec un système activateur provenant du même matériel.

γ - Les enzymes E_{0}^{90} de tissus de tabac cultivés in vitro ne contiennent pratiquement pas d'activité squalène - synthétasique ; elles synthétisent par contre activement du farnésol (figure 6 a).

δ - L'addition aux enzymes E_{0}^{90} de microsomes de rat provoque une stimulation également très importante de la synthèse du squalène (figure 6 b).

ε - Le pourcentage d'acide mévalonique (d) métabolisé en squalène dépasse 10 % dans le cas des incubations mixtes de microsomes de tabac et d'enzymes de rat.

ζ - Dans tous les cas, aucun produit postérieur dans la biosynthèse des stérols n'est décelé. En particulier, l'époxyde - 2 : 3 de squalène ne se forme pas.

η - Ce type d'expériences a été effectué trois fois. Les résultats obtenus se sont avérés tout-à-fait reproductibles.

c - Discussion

La discussion de la signification de ces expériences portera sur trois points :

- l'interchangeabilité de nos systèmes solubles et particulaires de foie et de plantes

- la stimulation très nette de la synthèse du squalène avec des systèmes mixtes

- le blocage de la chaine biosynthétique au niveau du squalène

Avant d'entamer cette discussion, nous devons rappeler que la voie biosynthétique conduisant aux stérols des plantes est identique à celle conduisant aux stérols des animaux jusqu'à l'époxyde-2:3 de squalène ; à partir de cette substance, il semble y avoir des différences profondes :

- dans le foie de rat, le triterpène provenant de la cyclisation de l'époxyde de squalène est le lanostérol.

- dans les tissus de tabac cultivés *in vitro*, le triterpène que nous avons identifié est le cycloarténol.

Quelque soit le rôle du cycloarténol dans la biosynthèse des stérols contenus dans les tissus de tabac cultivés *in vitro*, on peut déjà affirmer d'après la structure des substances identifiées que les voies métaboliques conduisant aux stérols des tissus de tabac cultivés *in vitro* sont différentes de celles conduisant au cholestérol dans le foie de rat.

α - On sait que dans le cas du foie de rat, les enzymes assurant la marche des étapes antérieures au pyrophosphate de farnésyle sont solubles, alors que les enzymes catalysant les étapes postérieures (squalène - synthétase, squalène - oxydase, etc...) sont particulaires (6 et 8).

Ce que nous savons déjà sur les systèmes acellulaires extraits de tissus de tabac cultivés *in vitro* nous permet de supposer que la répartition intracellulaire des enzymes est identique dans ce matériel.

Si cette hypothèse est exacte, on comprend très bien que les systèmes solubles extraits des deux matériels soient interchangeables ; ils sont tous les deux capables de synthétiser le pyrophosphate de farnésyle, précurseur commun du squalène dans les deux matériels.

Ainsi, la spécificité de chaque chaine biosynthétique réside exclusivement dans la fraction microsomiale ; il est cependant très regrettable que nous n'ayons pu vérifier ce point en observant la

synthèse de :

- cycloarténol avec le système mixte composé de microsomes de tissus de tabac cultivés _in vitro_ et d'enzymes de rat

- lanostérol avec le système mixte composé de microsomes de rat et d'enzymes de cultures de tissus de tabac.

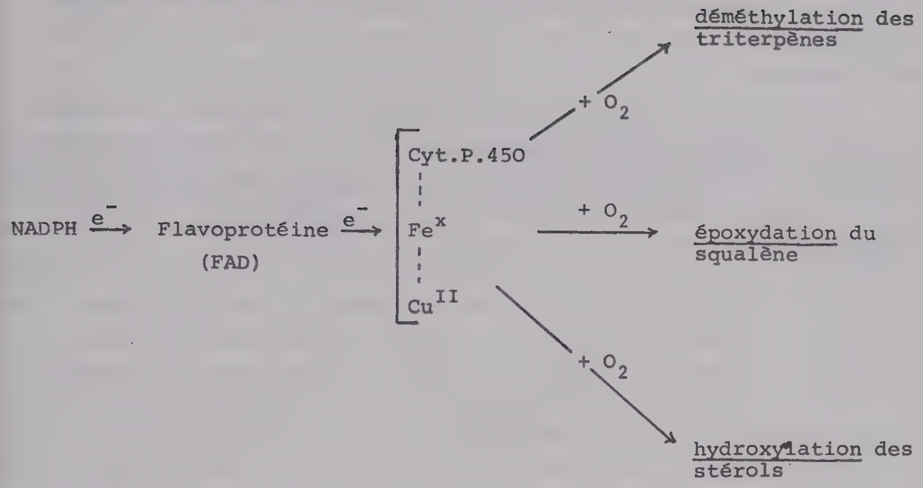
β - La stimulation très nette de la synthèse de squalène obtenue avec le système mixte microsomes - tissus de tabac cultivés _in vitro_ + enzymes de rat montre bien que les enzymes solubles de foie de rat sont bien plus actives que les enzymes solubles de tissus de tabac cultivés _in vitro_. Dans nos expériences ultérieures, nous aurons toujours intérêt à utiliser pour nos incubations de microsomes de plantes un système d'enzymes solubles de foie de rat.

γ - Comment expliquer que dans les deux expériences d'incubations croisées, on n'aille pas plus loin que le squalène ?

Avant de discuter ce point, rappelons quelques notions évoquées déjà dans l'introduction.

L'ensemble du système enzymatique assurant la synthèse du squalène à partir d'acide mévalonique comprend (tableau I) des kinases 1 et 2, une décarboxylase 3, une isomérase 4, des transférases 5 et la squalène - synthétase 6.

A partir du squalène interviennent des enzymes totalement différentes : ce sont des oxydases. Ces dernières sont extrêmement complexes et relativement mal connues. Suivant MASON (46), STAUDINGER (47) et ESTABROOK (48) elles consisteraient en une chaine de transporteurs d'électrons. Nous reproduisons ci-dessous un schéma proposé par MASON (46).



oxydases à
fractions multiples

On voit sur ce schéma que ces enzymes interviennent dans l'ensemble des processus oxydatifs conduisant du squalène au cholestérol.

*Dans le cas du système mixte microsomes de tissus de tabac cultivés <u>in vitro</u> - enzymes de rat, on peut penser que les enzymes responsables de l'époxydation du squalène, enzymes particulaires, sont dénaturées irréversiblement au moment de l'homogénéisation des cultures. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons l'intention d'effectuer une mesure d'activité enzymatique sur les microsomes : cette mesure consiste en l'évaluation du pouvoir hydroxylant de notre fraction microsomiale vis-à-vis de l'acétanilide (substrat classique d'hydroxylation) (47).

Dans le cas du système mixte composé de microsomes de rat et d'enzymes de tissus de tabac cultivés *in vitro*, les microsomes de rat sont en principe fonctionnels. Il faut donc admettre que les enzymes de tissus de tabac cultivés *in vitro* apportent avec elles un facteur inhibiteur.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons l'intention d'ajouter au système composé de microsomes de rat et d'enzymes de rat des quantités croissantes d'enzymes de tissus de tabac cultivés *in vitro* et d'observer peut-être l'inhibition progressive de la biosynthèse du cholestérol.

-=-=-=-=-=-

CONCLUSION

Nous avons mis au point un système acellulaire extrait de tissus de tabac cultivés in vitro et capable de synthétiser in vitro du squalène.

Ce système est composé de microsomes ; il exige pour fonctionner, lorsque l'acide mévalonique est utilisé comme précurseur, une fraction enzymatique soluble dont le rôle consiste en l'activation de l'acide mévalonique, la formation de l'unité isoprénique active, et la synthèse à partir de cette dernière du pyrophosphate de farnésyle. Cette fraction soluble est obtenue à partir du surnageant S_{100} provenant de l'ultracentrifugation d'un homogénat de tissus de tabac cultivés in vitro. Nous avons également expérimenté une fraction enzymatique analogue extraite de foie de rat ; cette dernière s'est avérée beaucoup plus active que la fraction obtenue à partir de cultures de tissus de tabac.

Ce système comporte ainsi deux phases :

- une phase aqueuse qui contient les enzymes nécessaires à la formation, à partir de l'acide mévalonique, du pyrophosphate de farnésyle.

- une phase lipoprotéique ("microsomes") qui assure la transformation du pyrophosphate de farnésyle, substance hydrosoluble, en squalène, hydrocarbure évidemment insoluble dans l'eau.

Dans aucun cas nous n'avons observé la formation de métabolites postérieurs au squalène dans la chaine biosynthétique conduisant aux stérols. Par contre, des expériences identiques effectuées à partir de systèmes acellulaires extraits de foie de rat nous ont donné, comme on pouvait s'y attendre, d'actives synthèses de cholestérol.

On pouvait alors penser à la présence dans les homogénats extraits de tissus de tabac cultivés in vitro de substances inhibitrices des oxydases responsables de la formation de l'époxyde de

squalène et également de la conversion du lanostérol (ou du cycloarténol) en stérols. Nous ignorons pour le moment la nature de ces substances. Cependant ces dernières pourraient être des phénols, très abondants dans ce matériel (49), et dont le rôle inhibiteur a été maintes fois mis en évidence dans les systèmes acellulaires de plantes (35).

-=-=-=-=-=-=-

BIBLIOGRAPHIE
II PARTIE

1 - N.W. NIRENBERG et J.H. MATTHAEI, Proc. Natl. Acad. U.S. 47, 1588, 1961

2 - N.L.R. BUCHER, J. Amer. Chem. Soc., 75, 498, 1953.

3 - T.T. TCHEN et K. BLOCH, J. Biol. Chem. 226 (2), 921, 1957.

4 - J.A. OLSON, M. LINDBERG et K. BLOCH, J. Biol. Chem. 226 (2), 941 1957.

5 - G. POPJAK, L. GOSSELIN, I. YOUHOTSKY - GORE et R.G. GOULD, Biochem. J. 69, 238, 1958.

6 - G. POPJAK, Ciba Found. Symp. p 148, Churchill Ltd. London, 1959.

7 - P.W. HOLLOWAY et G. POPJAK, Biochem. J. 104, 57, 1967.

8 - G. POPJAK et R.H. CORNFORTH, in "Methods in Enzymology", vol.XII Acad. Press., New-York (sous presse)

9 - D.H. SHAH, W.W CLELAND et J.W. PORTER, J. Biol. Chem., 240 (5), 1946, 1965.

10 - G. KRISHNA, H.W. WHITLOCK Jr., D.H. FELDBRUEGGE et J.W. PORTER, Arch. Biochem. Biophys., 114, 200, 1966.

11 - B.W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNING et F. LYNEN, J. Biol. Chem. 235, 326, 1960.

12 - F. LYNEN, B.W. AGRANOFF, H. EGGERER, U. HENNING, E.N. MÖSLEIN, Angew. Chem. 71, 657, 1959.

13 - T.T. TCHEN, J. Biol. Chem. 233, 1100, 1958.

14 - W.D. LOOMIS et J. BATTAILE, Biochim. Biophys. Acta, 67, 54, 1963.

15 - T.T. TCHEN in "Method in Enzymology" Vol. V p. 489
Vol. VI p. 505
Acad. Press N.Y.

16 - H. HELLIG et G. POPJAK, J. Lipid. Res. 2, 235, 1961.

17 - K. BLOCH, S. CHAYKIN, A.H. PHILLIPS et A. de WARD, J. Biol. Chem. 234, 2595, 1959.

18 - H. HELLIG et G. POPJAK, Biochem. J. 80, 47 p, 1961.

19 - J.W. CORNFORTH, R.H. CORNFORTH, C. DONNINGER et G. POPJAK, Proc. Roy. Soc. B., 163, 492, 1966.

20 - C.R. BENEDICT, J. KETT et J.W. PORTER, Arch. Biochem. Biophys. 110, 611, 1965.

J. KEVIN DORSEY, J.A. DORSEY et J.W. PORTER, J. Biol. Chem. 241 (22), 5353, 1966.

21 - P.D.C. DEAN, P.R. ORTIZ de MONTELLANO, K. BLOCH et E.J. COREY, J. Biol. Chem. 242 (12), 3014, 1967.

22 - H.S. MASON, Advances in Enzymol., 19, 79, 1957.

23 - R.B. CLAYTON, Quaterly Reviews, 19 (2), 168, 1965.

24 - C.J. POLLARD, J. BONNER, A.J. HAAGEN - SMIT et C.C. NIMMO, Plant Phys. 41, 66, 1966.

25 - L.J. ROGERS, S.P.J. SHAH et T.W. GOODWIN, Biochem. J., 99, 381, 1966.

26 - J.M. CHARLTON, K.J. TREHARNE et T.W. GOODWIN, Biochem. J. 101 (2) 7 p, 1966.

27 - D.G. ANDERSON et J.W. PORTER, Arch. Biochem. Biophys. 97, 509, 1962.

28 - D.G. ANDERSON et J.W. PORTER, Arch. Biochem. Biophys. 102, 26, 1963.

29 - P. VALENZUELA , E. BEYTIA , O. CORI et A. YUDELEVICH Arch. Biochem. Biophys. 113, 536, 1966.

30 - E. CAPSTACK, N. ROSIN, G.A. BLONDIN et W.R. NES, J. Biol. Chem. 240 (8), 3258, 1965.

31 - J.E. GRAEBE, D.T. DENNIS, C.D. UPPER et C.A. WEST, J. Biol. Chem. 240, 1847, 1965.

32 - C.D. UPPER et C.A. WEST, J. Biol. Chem., 242 (14), 3285, 1967.

33 - D.T. DENNIS et C.A. WEST, Ibid. 242 (14), 3293, 1967.

34 - G. PONSINET et G. OURISSON, Phytochem. 6, 1235, 1967.

35 - W.D. LOOMIS et J. BATTAILE, Phytochem. 5, 423, 1966.

36 - P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, Phytochem. 5, 31, 1966.

37 - P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, Phytochem. 5, 45, 1966.

38 - P. BENVENISTE et R.A. MASSY - WESTROPP, Tetrah. Letters, 37,

3553, 1967.

39 - C.J. CHESTERTON, Biochem. Biophys. Res. Commun., 25 (2), 205,1966

40 - D. SPENCER et S.G. WILDMANN, Biochemistry, 3 (7), 954, 1964.

41 - O.H. LOWRY , N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, et R.J. RANDALL, J. Biol Chem. 193, 265, 1951.

42 - N.K. BOARDMAN, R.I.B. FRANCKI et S.G. WILDMAN, J. Mol. Biol. 17, 470, 1966.

43 - E.N. SVETAILO, I.I. PHILIPPOVITCH et N.M. SISSAKIAN, J. Mol. Biol 24, 405, 1967.

44 - J.E. GRAEBE et G.D. NOVELLI , Experimental Cell Research, 41,521, 1966.

45 - I.M. HEILBRONN, E.D. KAMM et W.M. OWEN, J. Chem. Soc., 1631,1926.

46 - H.S. MASON, T. YAMANO, J.C. NORTH, Y. HASHIMOTO et P. SAKAGISHI, Oxidases and relates redox systems, vol. II, p. 879, John Wiley and sons, Inc. New - York, 1965.

47 - H.J. STAUDINGER, B. KEREKJARTO, V. UHLRICH et Z. ZUBRZYCKI, ibid. p. 815.

48 - T. OMURA, R. SATO, D.Y. COOPER, O. ROSENTHAL et R.W. ESTABROOK, Fed. Proc. 24, 1181, 1965.

49 - B. FRITIG, L. HIRTH et G. OURISSON, C.R. Acad. Sci. Paris, 263, p. 860, 1966.

-=-=-=-=-

TABLE DES MATIERES

Pages

Ière PARTIE : LA BIOSYNTHESE DES STEROLS DANS LES TISSUS DE TABAC CULTIVES IN VITRO

INTRODUCTION.. 2

RESULTATS... 13

A - Identification et isolement de terpénoïdes............. 13

B - Utilisation des éléments marqués....................... 16

DISCUSSION.. 18

A - Les stérols... 18

B - Les méthyl-4 stérols.................................... 21

C - Les diméthyl-4,4 stérols................................ 23

D - Mise au point de schémas biosynthétiques................ 28

CONCLUSION.. 38

PARTIE EXPERIMENTALE.. 39

BIBLIOGRAPHIE... 53

IIème PARTIE : BIOSYNTHESE DU SQUALENE DANS UN SYSTEME ACELLULAIRE EXTRAIT DE TISSUS DE TABAC CULTIVES IN VITRO

INTRODUCTION.. 59

I - PREPARATION DE FRACTION SUBCELLULAIRES................... 68

1 - Nature de la fraction microsomiale obtenue..... 68

2 - Nature des autres fractions particulaires...... 71

II - INCUBATIONS.. 72

1 - Essais avec les surnageants S_{30}................ 72

2 - Incubation de fractions particulaires.......... 78

3 - Incubations avec des enzymes précipitées au sulfate d'ammonium.......................... 82
4 - Expériences d'incubations croisées........... 84
a - préparation d'enzymes de foie de rat.. 84
b - incubations......................... 84
c - discussion.......................... 88

CONCLUSION.. 93

BIBLIOGRAPHIE... 95

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde thèse :

"PROBLEMES POSES PAR LA BIOSYNTHESE DES
PROTEINES DANS DES SYSTEMES ACELLULAIRES
DE PLANTES."

Strasbourg, le 20 novembre 1967

Le Président du Jury,

G. OURISSON

VU et permis d'imprimer

Strasbourg, le 4 décembre 1967

P. le Doyen
L'Assesseur

BRENET